

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Martin Váchal**

Fenomén vzniku perzistence u bakterií – vliv toxin-antitoxin systémů

The phenomenon of persistence in bacteria – the role of toxin-antitoxin  
systems

Bakalářská práce

Školitel: **RNDr. Irena Lichá, CSc.**

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně na základě konzultací se svým školitelem, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 05. 2015

.....  
Martin Váchal

## Abstrakt

Většina současně studovaných bakteriálních druhů je schopna tvořit malou heterogenní frakci perzistentních buněk, tolerantních k řadě antibiotik, a přesto geneticky identických s citlivou mateřskou populací. Bakteriální perzisteři vznikají stochastickou regulací buněčných procesů buďto po indukci vnějším stresovým stimulem nebo spontánně i v podmínkách příznivých pro růst. Podle způsobu vzniku byli rozděleni na perzistery typu I a perzistery typu II. Mnoho recentních studií prokázalo uplatnění toxin-antitoxin (TA) systémů v perzistenci. TA systémy jsou běžně se vyskytující genetické elementy prokaryot. Sestávají se ze stabilního proteinového toxinu, inhibujícího určitý esenciální buněčný proces, a nestabilního antitoxinu, který účinek toxinu neutralizuje. Toxinové části jsou u perzisterů silně exprimované a v nadbytku nad antitoxiny mají zřejmě zásadní roli v navození tolerance k antibiotikům (MDT). Tato práce shrnuje příčiny vzniku perzisterů i jejich hypotetické strategie přežití, a zabývá se především TA systémy, kontrolujícími perzistenci modelového organismu *Escherichia coli*. Důraz je kladen na popis molekulárních mechanismů toxicity a její regulaci u TisB/IstR-1 TA systému typu I, HipBA, RelBE, MazEF, DinJ-YafQ, MqsRA TA systémů typu II a GhoST TA systému typu V.

**Klíčová slova:** perzistence, bakterie, toxin-antitoxin systémy, TisB-IstR, HipBA, RelBE, MazEF, DinJ-YafQ, MqsRA, GhoST

## Abstract

Most bacterial species currently studied are able to generate a small fraction of heterogeneous persister cells which are tolerant to antibiotics or other antimicrobials and still genetically identical to the susceptible parental population. Bacterial persisters emerge as a result of the stochastic regulation of cellular processes. Persistence can be triggered by stressful environmental stimuli or emerge spontaneously under favourable growth conditions. According to their origin, persistent subpopulations were divided into type I and type II persisters. Many recent studies indicate that toxin-antitoxin (TA) systems increase persistence. TA systems are ubiquitous genetic elements in prokaryotes and consist of a stable toxin, inhibiting essential cellular functions in persister cells, and an unstable antitoxin, which counteracts the activity of its toxin. Overexpression of toxin parts in excess of their corresponding antitoxin leads to multidrug tolerance (MDT). This work summarizes causes of persister formation and their hypothetical survival strategies and deals primarily with TA systems, controlling bacterial persistence of model organism *Escherichia coli*. The emphasis is put on the description of type I TA system TisB/IstR-1, type II TA systems HipBA, RelBE, MazEF, DinJ-YafQ, MqsRA, type V TA system GhoST and their molecular mechanisms of toxicity and its regulation.

**Key words:** persistence, bacteria, toxin-antitoxin systems, TisB-IstR, HipBA, RelBE, MazEF, DinJ-YafQ, MqsRA, GhoST

## Seznam zkratk

TA	toxin-antitoxin
MDT	tolerance k antibiotikům (multidrug tolerance)
wt	divoký typ (wild-type)
MDR	multirezistence (multidrug resistance)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
CFU	kolonii tvořící jednotka (colony forming unit)
QS	quorum sensing
(p)ppGpp	guanosin (pentafosfát) tetrafosfát
RNAP	RNA polymeráza
PPX	exopolyfosfatáza
PolyP	polyfosfát
PPK	polyfosfát kináza
INH	isoniazid
sRNA	malá regulační molekula RNA (small regulatory RNA)
nt	nukleotid
RBS	místo nasedání ribozomu (ribosome binding site)
5' UTR	5' nepřekládaná oblast (5' untranslated region)
ORF	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
GltX	glutamyl-tRNA syntetáza
aSD	anti-Shine-Dalgarno sekvence

# Obsah

1. Úvod .....	1
2. Historický úvod .....	1
3. Strategie přežití perzisterů .....	2
3.1. Perzistence typu I .....	5
3.2. Perzistence typu II .....	7
4. Toxin-antitoxin systémy a perzistence .....	9
4.1. Toxin-antitoxin systémy typu I .....	9
4.1.1. TisB-IstR toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie <i>E. coli</i> .....	10
4.2. Toxin-antitoxin systémy typu II .....	13
4.2.1. HipBA toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie <i>E. coli</i> .....	13
4.2.2. RelBE toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie <i>E. coli</i> .....	15
4.2.3. MazEF toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie <i>E. coli</i> .....	18
4.2.4. MqsRA toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie <i>E. coli</i> .....	20
4.2.5. DinJ-YafQ toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie <i>E. coli</i> .....	23
4.3. Toxin-antitoxin systémy typu V .....	25
4.3.1. GhoST toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie <i>E. coli</i> .....	26
5. Závěr .....	27
6. Použitá literatura .....	28

# 1. Úvod

Fenomén bakteriální perzistence byl poprvé popsán již před více než 70 lety, a přesto dodnes není podstata jejího vzniku zcela objasněna.

Perzistence vzniká stochastickou regulací buněčných procesů a může být indukována stresovými environmentálními stimuly nebo vzniká fenotypovým přesmykem i v podmínkách příznivých pro růst. Perzisteři tvoří v geneticky identické populaci malou, fyziologicky heterogenní frakci fenotypových variant divokého typu (wt). Jsou to nerostoucí nebo pomalu rostoucí buňky, které podle nejvíce akceptované hypotézy setrvávají v dormantním stavu, ve kterém jsou schopny dočasně tolerovat řadu antibiotik. MDT není na rozdíl od multirezistence (MDR) podmíněna změnou genetické informace. Po odstranění selekčního tlaku, který zahubí citlivou majoritní část populace, se perzisteři navrací fenotypovým přesmykem k růstu a dávají vzniknout nové isogenní populaci citlivých buněk. Za jedny z hlavních efektorů bakteriální perzistence jsou dnes považovány toxin-antitoxin systémy.

Bakteriální perzistence představuje jeden z vážných problémů u imunosuprimovaných pacientů. Je považována za příčinu relapsu infekčních onemocnění, často vedoucích až ke smrti pacienta. Jsou to chronické choroby způsobené nejrůznějšími patogeny, jako jsou *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* a další.

## 2. Historický úvod

První zmínka o malé frakci bakteriální populace tolerující léčbu antibiotiky pochází už z doby počátku studia antibiotik samotných. Gladys Hobby a spolupracovníci zaznamenali ve své studii 1% nerostoucích bakterií *Staphylococcus aureus*, které přežily vystavení penicilinu (Hobby *et al.*, 1942).

Tyto buňky byly následně pojmenovány jako „perzisteři“ (Bigger, 1944). Joseph Bigger zjistil, že po aplikaci penicilinu do kultury *Staphylococcus aureus pyogenes* přežije přibližně jeden jedinec z milionu inokulovaných a po odstranění penicilinu dají perzisteři vzniknout nové populaci buněk, k penicilinu opět citlivých. Na základě svých pozorování definoval perzistery jako nerostoucí, dormantní buňky, jejichž tolerance k penicilinu není na rozdíl od rezistence způsobena změnami genetické informace.

Perzisterům však nebyla věnována příliš velká pozornost. Mnoho vědců se zabývalo fenoménem bakteriální rezistence, která odstartovala „hon“ za výrobou nových antibiotik. Až čtyři desetiletí od popsání perzisterů odvedli Harris Moyed a K. P. Bertrand průkopnickou práci na poli bakteriální perzistence (Moyed & Bertrand, 1983). Při léčení ampicilinem izolovali bakterie *Escherichia coli* K-12, nesoucí mutaci v genu *hipA*, jehož mutantní alela *hipA7* byla odpovědná za

výskyt přibližně tisíckrát většího množství perzisterů v populaci. Perzistentní mutanti se používají ke studiu perzistence dodnes, jelikož wt perzisteři tvoří velmi malou frakci populace.

Dormance perzisterů byla dlouhou dobu považována za dostatečné vysvětlení MDT a Biggerova definice perzisterů zůstala po celé 20. století v zásadě nezměněna. Až v poslední dekádě se perzisteři stali cílem výzkumu mnoha vědeckých týmů a i díky technologickým a metodickým pokrokům je původní definice rozšiřována o nové poznatky, které ovšem stále poskytují daleko více otázek než odpovědí.

### 3. Strategie přežití perzisterů

Nejvíce akceptovanou hypotézou vysvětlující MDT perzisterů je navození dormance. Bylo navrženo, že MDT spočívá v redukci činnosti buněčných procesů, jejichž specifické struktury jsou běžně cílem vazby antibiotik. Perzisteři jsou následně schopni tolerance, jelikož po vazbě antibiotik nedochází k vytvoření poškozených buněčných produktů způsobujících buněčnou smrt (Keren, Shah, *et al.*, 2004). Experimentální důkazy podporující tuto hypotézu pochází z analýz transkriptomu perzistentních buněk *E. coli* či *M. tuberculosis*, které ukázaly slabou expresi genů pro produkci energie a biosyntetické i metabolické dráhy (Keren *et al.*, 2011; Keren, Shah, *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2006).

Recentní studie však naznačují, že perzistence je mnohem více komplexní než pouhá dormance (Orman & Brynildsen, 2013). Podle této studie nemusí být dormance sama o sobě dostatečná či vůbec k MDT potřebná a pouze zvyšuje pravděpodobnost buněk stát se perzisterem.

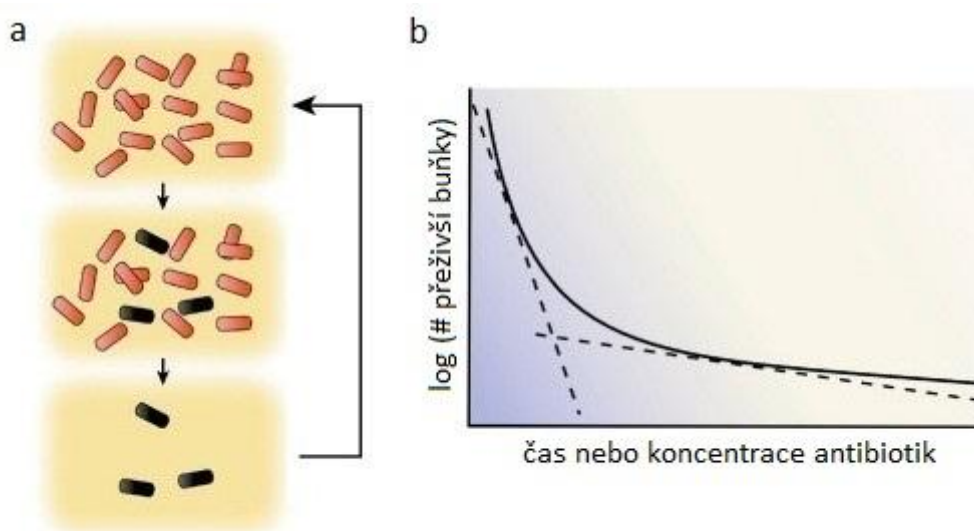
Jedna ze studií poukazuje na roli aktivních mechanismů, které vyvolávají MDT, ale nespočívají přímo v pasivním tolerování antibiotik inaktivací buněčných procesů. Jedná se o odpověď buňky na nutriční limitaci, která prostřednictvím stringentní odpovědi aktivuje obranu proti reaktivním formám kyslíku (ROS), jejichž produkce je vyvolána baktericidními antibiotiky (Nguyen *et al.*, 2011). Tato studie je v souladu s hypotézou, která tvrdí, že hlavní smrtící efekt baktericidních antibiotik je vyvolání produkce ROS, nehledě na cíl vazby antibiotik (Kohanski *et al.*, 2007). Tato hypotéza však byla zpochybněna recentními studiemi, které ukázaly, že antibiotika jsou schopná zabíjet bakterie i v anaerobních podmínkách (Keren *et al.*, 2013; Liu & Imlay, 2013). Nicméně, to pouze poukazuje na jiný mechanismus zabíjení baktericidními antibiotiky, a tudíž nevylučuje uplatnění antioxidantních mechanismů v perzistenci. Jestli perzistentní buňky během nutriční limitace tolerují antibiotika pouze pasivní dormancí, nebo zdali stringentní odpověď aktivuje jiné aktivní mechanismy tolerance, musí být ještě objasněno.



Další nedávné studie poukazují na speciální případy perzistentních mykobakterií schopných tolerance specifickými mechanismy, které jim umožní normálně růst v přítomnosti antimikrobiální látky (Adams *et al.*, 2011; Wakamoto *et al.*, 2013).

Studium takto malé heterogenní frakce fenotypových variant, měnících se spontánně i v závislosti na prostředí, je velmi složité. Dormance perzisterů je však i přes nové studie stále považována za hlavní aspekt perzistence, ačkoliv mechanismům tvorby perzisterů ještě detailně nerozumíme.

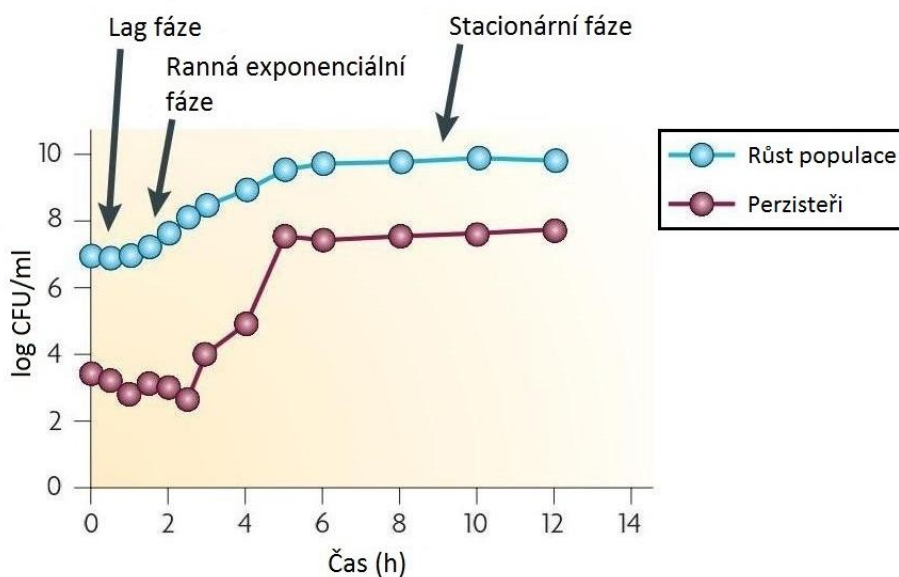
Po vystavení bakteriální populace obsahující frakci perzistentních buněk smrtícímu efektu antibiotik, nastává rychlý úbytek citlivých bakterií. Ten se po určité době výrazně zpomalí a množství buněk v populaci se nezvyšuje, což indikuje přítomnost perzisterů (viz Obr. 1b). Po odstranění antibiotik se perzisteři navrací fenotypovým přesmykem k růstu a dávají vzniknout nové isogenní populaci citlivých buněk (viz Obr. 1a), ve které se vytváří téměř stejné množství perzisterů jako v původní populaci (Keren, Kaldalu, *et al.*, 2004).



Obr. 1: (a) Isogenní populace bakteriálních buněk citlivých k antibiotiku (červená), ve které se vytváří malá frakce perzistentních fenotypových variant (černá). Po aplikaci antibiotik přežívají perzistentní buňky, zatímco buňky citlivé jsou zahubeny. Po odstranění antibiotik dávají perzisteři vzniknout nové isogenní populaci. (b) Dvoufázový průběh úbytku bakteriální populace po aplikaci antibiotik (plná čára). Počáteční rychlý exponenciální úbytek (strmá čárkovaná osa) je ve druhé fázi nahrazen mnohem pomalejším úbytkem přeživších perzisterů (postupně klesající čárkovaná osa) (převzato a upraveno z Kint *et al.*, 2012).

Množství vytvářejících se perzisterů v bakteriální populaci závisí na fázi růstu, ve které se populace nachází (viz Obr. 2) (Keren, Kaldalu, *et al.*, 2004). V lag fázi a v ranné exponenciální fázi růstu populace je množství perzisterů nejmenší a výrazně se nemění. Perzisteři se zde nevytváří *de novo* a jejich množství závisí na velikosti inokula buněk ze stacionární fáze. Jedna část perzisterů se

v ranné exponenciální fázi navrací k růstu, což se projeví lehkým poklesem počtu perzisterů, a druhá část dále perzistuje. V dalším průběhu exponenciální fáze dochází ke zvyšování počtu perzisterů. Na začátku střední exponenciální fáze se v populaci vytváří přibližně 0,001% perzisterů. Jejich množství dosáhne vrcholu ve fázi stacionární, kde mohou perzisteři tvořit až 1% populace. Počet perzisterů se ve stacionární fázi opět výrazně nemění. Kvantita vytvořených perzisterů závisí na druhu i kmeni bakterie, na stáří kultury, na použitém antibiotiku a jeho koncentraci a i na podmínkách kultivace (Keren, Kaldalu, *et al.*, 2004; Luidalepp *et al.*, 2011). Trend však zůstává typicky stejný.



Obr. 2: Závislost množství perzistentních buněk na růstové fázi bakteriální populace (převzato a upraveno z Lewis, 2007).

Od objevení perzisterů chyběl po celé 20. století experimentální důkaz o jejich růstovém stavu. Až za využití mikrofluidních zařízení a mikroskopie, potvrdili Nathalie Balaban a spolupracovníci předpovídaný redukovaný růst perzistentních buněk *E. coli* a stanovili další charakteristické vlastnosti, podle kterých rozdělili perzistentní subpopulace na perzistery typu I a perzistery typu II (Balaban *et al.*, 2004). Perzisteři obou typů mohou koexistovat ve stejné populaci a jak perzisteři typu I, tak i perzisteři typu II obsahují fyziologicky heterogenní perzistentní buňky. Za vznik heterogenních perzisterů v geneticky identické populaci je odpovědná stochastická genová exprese vyplývající z fluktuací v transkripci a translaci navzdory vystavení stejným environmentálním podmínkám.

### 3.1. Perzistence typu I

Perzistenci typu I indukují vnější stresové podmínky. Perzisteři nerostou a vytváří se během pozdní exponenciální a stacionární fáze růstu populace. Po inokulaci perzistentních buněk ze stacionární fáze na čerstvé médium bez antibiotik se část přemění fenotypovým přesmykem zpět na buňky rostoucí, které dávají vzniknout nové isogenní populaci (Balaban *et al.*, 2004).

Hlavní spouštěč fenotypové diferenciaci na perzistentní buňky je nutriční limitace, ale kromě přímého nedostatku živin může perzistenci vyvolat i řada dalších faktorů jako poškození DNA, oxidativní stres, signalizace molekulami quorum sensing (QS) a mohou se vytvářet i v makrofázích.

Nedostatek aminokyselin, ale i jiných živin, vede u mnoha druhů bakterií ke spuštění stringentní odpovědi. Při nedostatku aminokyselin se „nenabitá“ deacylovaná tRNA váže do A-místa ribozomu, čímž stimuluje s ribozomem asociovaný enzym (p)ppGpp syntetázu RelA, produkt genu *relA*, ke spuštění syntézy guanosin (penta) tetrafosfátu – (p)ppGpp (Haseltine & Block, 1973; Wendrich *et al.*, 2002). Při nedostatku uhlíku (Xiao *et al.*, 1991), mastných kyselin (Battesti & Bouveret, 2006) či železa (Vinella *et al.*, 2005) je signál ke spuštění syntézy (p)ppGpp předán na cytoplazmatický enzym (p)ppGpp syntetázu SpoT, produkt genu *spoT*, která má mimo méně aktivní syntetické funkce navíc funkci (p)ppGpp hydrolázy (An *et al.*, 1979).

Alarmon (p)ppGpp inhibuje transkripci rRNA interakcí s RNA polymerázou (RNAP) a pokud je na RNAP navázán transkripční regulátor DksA, je inhibice transkripce zesílena (Paul *et al.*, 2004). (p)ppGpp v přítomnosti DksA zároveň pozitivně reguluje transkripci genů pro syntézu aminokyselin (Paul *et al.*, 2005). Nahromadění (p)ppGpp vede dále k inhibici aktivity hlavních buněčných procesů jako je DNA replikace (Maciąg *et al.*, 2010), translace (Svitil *et al.*, 1993) či syntéza fosfolipidů (Heath *et al.*, 1994). Předpokládá se, že (p)ppGpp je jedna z klíčových molekul vedoucích k navození dormance a MDT.

Recentní studie ukázaly, že ke spuštění syntézy (p)ppGpp vede i aktivita toxinu HipA (viz kapitola 4.2.1) a dále bylo prokázáno, že aktivita HipA toxinu zvyšuje perzistenci (Bokinsky *et al.*, 2013; Germain *et al.*, 2013).

Diferenciaci na perzistentní buňky můžou vyvolat i samotná antibiotika jako např. ciprofloxacin, který poškozuje DNA. Během ciprofloxacinem indukované SOS odpovědi dochází k transkripci a následné translaci TisB toxinu, který navodí perzistenci (viz kapitola 4.1.1).

Tolerance k antibiotikům je také charakteristický znak biofilmu, který je vytvářen mnoha druhy bakterií jako např. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* či *Escherichia coli*. Biofilm je považován za jednu z hlavních příčin relapsu chronických infekčních onemocnění. Bakterie jsou v biofilmu chráněny před imunitním systémem a po ukončení léčby antibiotiky v něm přežijí perzisteři obnovují populaci. Prostředí v biofilmu není všude stejné, což se odráží v heterogenitě

populace. Buňky vyskytující se v hloubi biofilmu postrádají dostatek esenciálních živin, jelikož se do této hloubi biofilmu prostou difuzí nedostanou a většina jich je spotřebována na periférii. Nedávno provedená studie ukázala, že nutriční limitace vede u frakce buněk v biofilmu ke zvýšení tolerance k ofloxacinu. Tolerance ofloxacinu nutričně limitovaných perzisterů v biofilmu závisí plně na SOS odpovědi, a studie dále ukázala, že při nedostatku leucinu závisí tolerance ofloxacinu také částečně na stringentní odpovědi. Zatím se neví, jakým způsobem jsou tyto stresové odpovědi propojeny k navození tolerance. SOS odpověď perzisterů v biofilmu ovšem není na rozdíl od SOS odpovědi planktonních perzisterů propojená s aktivací TA systémů, což poukazuje na zřejmé fyziologické rozdíly mezi planktonními perzistery a těmi v biofilmu (Bernier *et al.*, 2013).

Když bakteriální populace vstoupí do stacionární fáze, můžou jednotlivé bakterie produkovat různé signální molekuly, jako jsou molekuly QS nebo např. indol. Tyto molekuly koordinují chování populace a mohou ovlivnit buňky, které ještě nebyly danému stresu přímo vystaveny. Bylo prokázáno, že signalizace indolem v nutričně limitovaném prostředí (Vega *et al.*, 2012), stejně tak jako přímé vystavení oxidativnímu stresu (Wu *et al.*, 2012), může v populaci *E. coli* vyvolat tvorbu perzisterů aktivací antioxidantních mechanismů, které chrání buňku před účinkem antibiotik. Nová studie však zpochybňuje uplatnění indolu při zvyšování perzistence bakterie *E. coli*, ba naopak prokázala, že indol perzistenci bakterií snižuje (Hu *et al.*, 2015). Signalizace molekulami QS, jako je CSP feromon u *Streptococcus mutans* (Leung & Lévesque, 2012) či exogenní fenazin pyokyanin nebo acyl-homoserin lakton u *Pseudomonas aeruginosa* (Möker *et al.*, 2010), může také vyvolat tvorbu perzisterů, ovšem zatím neznámým mechanismem. 2' aminoacetofenon, další molekula QS, indukuje u *P. aeruginosa* perzistenci ovlivněním transkripce genů spojených s translací (Que *et al.*, 2013). Tyto studie ukazují, že perzistence není pouze izolovaný proces jednotlivců, ale je ovlivněna komunikací buněk v populaci.

Nutričně limitované a kyselé prostředí vakuol makrofágů, ve kterých se bakterie nachází po fagocytóze, může indukovat tvorbu perzisterů u *Salmonella* (Helaine *et al.*, 2014). Po pohlcení makrofágy byly v některých bakteriálních buňkách aktivovány TA systémy typu II a došlo k tvorbě nerostoucích perzisterů.

V neposlední řadě může perzistenci vyvolat také přechod na jiný zdroj uhlíku. Jestliže bakterie rostou na dvou zdrojích uhlíku, využívají nejdříve výhodnější z nich a až po jeho vyčerpání začnou metabolizovat ten druhý. Tento fenomén je nazýván diauxie (Monod, 1949). Diauxie je nejdříve charakterizována exponenciálním růstem populace na prvním zdroji uhlíku, který střídá krátká diauxní lag fáze, po níž nastává druhá exponenciální fáze růstu na druhém zdroji uhlíku. Dříve se myslelo, že v diauxní lag fázi, která se jeví jako zastavení růstu populace bakterií, dochází k enzymatické adaptaci buněk, tzv. „diauxnímu shiftu“, pro zpracování méně preferovaného zdroje uhlíku. Nová studie však tuto přes 70 let uznávanou hypotézu zpochybňuje (Solopova *et al.*, 2014).

Ukazuje, že v populaci *Lactococcus lactis* jsou v momentě vyčerpání preferovaného zdroje uhlíku dva typy buněk s odlišnými metabolickými strategiemi a pouze jeden typ je schopný pokračovat v růstu na druhém zdroji uhlíku, zatímco druhý typ zastaví růst. Při nedostatku preferovaného zdroje uhlíku dochází k postupné derepresi a následné expresi genů pro katabolismus méně výhodného zdroje uhlíku a buňka musí mít ještě dostatek energie k adaptaci. Pokud nedokáže přesmyknout dříve, než jí dojde energie, dochází k aktivaci stringentní odpovědi. Diauxní lag fáze je v tomto případě způsobena heterogenní odpovědí populace na koncentraci preferovaného zdroje uhlíku. Stringentní odpověď u *L. lactis* se však liší od stringentní odpovědi u *E. coli*, u níž bylo ukázáno, že přechod na jiný zdroj uhlíku stimuluje tvorbu perzisterů (Amato *et al.*, 2013). Amatova studie ukázala, že k vytvoření perzisterů během „diauxního shiftu“ jsou nezbytné jak molekuly (p)ppGpp a DksA tak i enzymy RelA a SpoT. Navýšení koncentrace (p)ppGpp vede ke zvýšení perzistence a tento proces může být zvrácen expresí SpoT. V tomto případě působí (p)ppGpp jako metabolický toxin, jehož enzymatickým antitoxinem je SpoT s hydrolytickou funkcí.

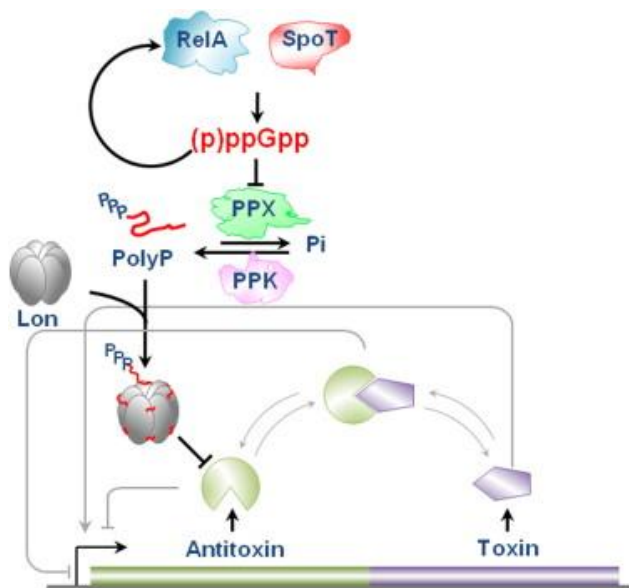
### 3.2. Perzistence typu II

Perzisteři typu II jsou na rozdíl od perzisterů typu I pomalu rostoucí buňky, dělí se řádově pomaleji než buňky normálně rostoucí a tvoří se stochasticky bez jakéhokoliv vnějšího spouštěče i v exponenciální fázi růstu populace. Po inokulaci perzistentních buněk do čerstvého média bez antibiotik se může pomalu rostoucí fenotyp předávat na dceřiné buňky po několika buněčných děleních, a až poté nastává stochastický fenotypový přesmyk zpět na buňky rostoucí (Balaban *et al.*, 2004).

Perzisteři typu II vznikají spontánním a stochastickým aktivováním stresových odpovědí v příznivých podmínkách. Toto spontánní vytváření perzisterů je opatření bakteriální populace proti případným budoucím stresovým podmínkám. Tento jev lze chápat jako bet-hedging strategii (Balaban *et al.*, 2004), při které většina populace roste a riskuje smrt, zatímco malá frakce redukuje růst. V příznivých podmínkách pro růst se poté fitness populace snižuje, ale jakmile se populace octne v podmínkách pro rostoucí buňky letální, může se fitness populace díky perzisterům výrazně zvýšit (Kussell *et al.*, 2005).

Maisonneuve a spolupracovníci popsali jeden z mechanismů vzniku perzisterů typu II a experimentálně zjistili, že množství (p)ppGpp v exponenciální fázi růstu náhodně fluktuuje v jednotlivých buňkách a ve vysokých koncentracích navozuje pomalý růst buněk (Maisonneuve *et al.*, 2013). (p)ppGpp vede k aktivaci toxinových částí TA systémů typu II (viz Obr. 3). (p)ppGpp inhibuje exopolyfosfatázu (PPX), která v aktivním stavu hydrolyticky odštěpuje koncové fosfáty z polyfosfátů (PolyP) (Akiyama *et al.*, 1993), a tím koncentrace (p)ppGpp kontroluje koncentraci PolyP (Kuroda *et al.*, 1997). PolyP je syntetizován polyfosfát kinázou (PPK) (Akiyama *et al.*, 1992) a funguje jako signální molekula, která vytváří komplex s Lon proteázou, čímž ji aktivuje a ta následně

degraduje všechny známé antitoxinové části TA systémů typu II u *E. coli* (Maisonneuve et al., 2013). Proteinové toxiny TA systémů typu II jsou poté po překročení určité kritické hladiny efektoři (p)ppGpp-indukované perzistence (Rotem et al., 2010). Navíc zde dochází k pozitivní zpětné vazbě na (p)ppGpp syntetáze RelA, která je pozitivně stimulována svým vlastním produktem (p)ppGpp, což umožní rychlou amplifikaci signálu. (Maisonneuve et al., 2013). Tento mechanismus se však s věkou pravděpodobností uplatňuje i u perzisterů typu I. (p)ppGpp funguje jako globální regulátor a mohla by to být cílová molekula, proti které nasměrovat výzkum léčiv proti perzisterům.



Obr. 3: (p)ppGpp syntetázy RelA a SpoT syntetizují alarmon (p)ppGpp, který inhibuje PPX, která hydrolyticky odštěpuje koncové fosfáty z PolyP, a tím umožní enzymu PPK kontinuálně syntetizovat PolyP. Nahromaděný PolyP tvoří komplex s Lon proteázou, a tím jí dává signál k degradaci antitoxinů. Následně dochází k derepresi TA promotoru (naznačeno šipkou směřující k promotoru TA operonu) a nahromadění toxinu. Toxiny poté inhibují translaci a pravděpodobně navodí dormantní stav odpovědný za MDT (převzato z Maisonneuve *et al.*, 2013).

Speciální případ perzistence představuje isoniazid-tolerantní *Mycobacterium smegmatis*, replikující se v přítomnosti isoniazidu (INH), který inhibuje syntézu buněčné stěny. INH je prekurzor, který musí být aktivován bakteriální katalázou KatG. KatG je produkována stochasticky a vyskytuje-li se v buňce v signifikantním množství, INH může působit. Na základě fluktuací koncentrace KatG se vytváří heterogenní populace buněk odlišně citlivých k INH (Wakamoto *et al.*, 2013). Tento mechanismus perzistence je ovšem spíše příklad atypického vyhýbání se účinkům specifické antimikrobiální látky nežli tolerance. Transkripce *katG* může být u některých bakterií indukována i při oxidativním stresu (Wu *et al.*, 2012).

## 4. Toxin-antitoxin systémy a perzistence

Vznik perzistentního fenotypu je komplexní děj a na jeho vzniku se podílí velké množství genů. Výlučné postavení však zauímají TA systémy, které mají klíčovou roli v navození MDT perzisterů. Od objevení perzistentního genu *hipA*, kódujícího toxinovou část TA systému HipBA, přibývá stále více studií podporujících roli TA systémů v perzistenci.

Studie využívající technologickou metodu DNA čipů ukázaly u perzisterů bakterie *E. coli* zvýšenou expresi toxinových částí TA systémů a současný výzkum perzistence je na jejich studium silně zaměřen (Keren, Shah, *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2006).

Geny pro toxin-antitoxin systémy mají téměř všechny bakterie. Většina těchto genů se nachází na chromozomech, ale mohou se vyskytovat i na plasmidech. TA systémy uplatňující se v perzistenci však byly prozatím identifikovány pouze na chromozomální DNA.

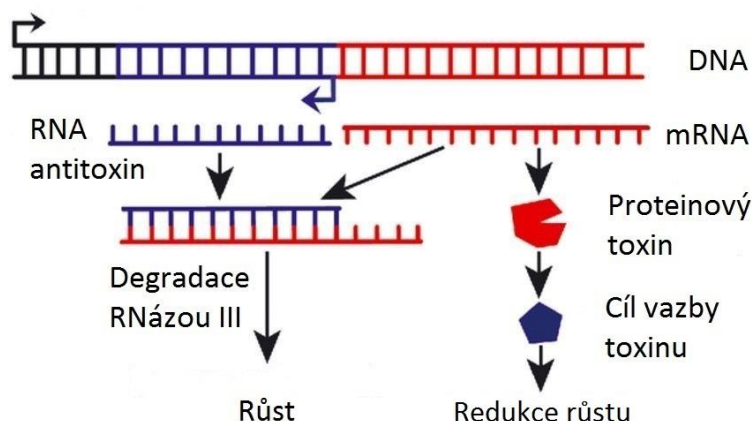
Za normálních okolností je toxin neutralizován nestabilním antitoxinem. Během stresových podmínek dochází k degradaci antitoxinů proteázami, což vede k aktivaci toxinů. Aktivní toxiny mají v perzistenci roli inhibitorů syntézy makromolekul a mohou navodit MDT, pokud jejich koncentrace stochasticky překročí kritickou hladinu. Míra tohoto prahu a stochasticita genové exprese determinují velikost frakce perzisterů v populaci (Rotem *et al.*, 2010).

TA systémy mají v buňce mimo navození perzistence řadu dalších funkcí. Podílí se např. na regulaci různých genů, programované buněčné smrti, kontrole růstu či na regulaci propagace bakteriofágů (Magnuson, 2007). Jsou velmi rozmanité, redundantní a mohou být funkčně koordinované (Fasani & Savageau, 2013).

TA systémy jsou klasifikovány na základě povahy antitoxinu a jeho způsobu neutralizace aktivity toxinu. Doposud bylo identifikováno pět typů TA systémů. V perzistenci se uplatňují především TA systémy typu II, ale i jeden TA systém typu I a jeden TA systém typu V.

### 4.1. Toxin-antitoxin systémy typu I

U TA systémů typu I probíhá neutralizace toxinu antitoxinem na úrovni RNA. Ve většině případů jsou toxin a antitoxin kódováni na opačném vlákně dvouvláknové DNA a směry jejich transkripce jsou divergentní. Antitoxiny jsou malé regulační molekuly RNA (sRNA) o velikosti typicky 50 až 200 nukleotidů (nt), které komplementárně párují s toxinovou mRNA a po vytvoření sRNA-mRNA duplexu dochází k zabránění nasednutí ribozomu na místo nasedání ribozomu (RBS) a degradaci duplexu.



Obr. 4: Schéma mechanismu účinku toxin-antitoxin systémů typu I. Navázání toxinu na svůj cíl vede k redukci růstu buňky. Vazba příslušného sRNA antitoxinu na toxinovou mRNA vede k inhibici translace toxinu a následné degradaci RNA-RNA duplexu RNázou III (převzato a upraveno z Wen *et al.*, 2014).

#### 4.1.1. TisB-IstR toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie *E. coli*

Při poškození DNA, které je způsobeno antibiotiky jako je ciprofloxacin, dochází u bakterie *E. coli* ke spuštění SOS odpovědi (Phillips *et al.*, 1987), která indukuje toleranci k fluorochinolonům (Dörr *et al.*, 2009). Fluorochinolony, mezi které ciprofloxacin patří, inhibují ligázovou aktivitu DNA gyrázy, ale i jiných topoizomeráz. Topoizomerázy jsou poté neschopné spojit fragmenty DNA, které rozštěpily (Chen *et al.*, 1996).

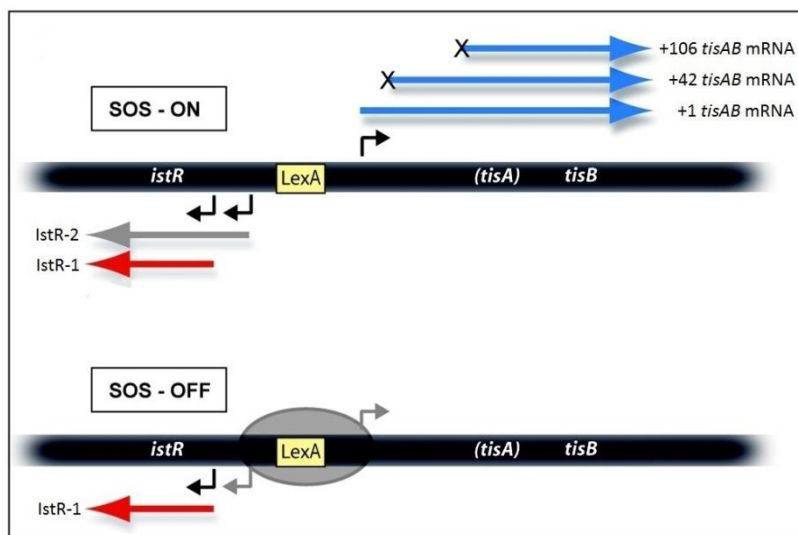
V zahájení SOS odpovědi má klíčovou roli enzym RecA, který je enzymem RecBCD naváděn na místa poškození DNA a uplatňuje se při jejich opravách (Anderson & Kowalczykowski, 1997). RecA však působí také jako proteázový kofaktor, který stimuluje autokatalytické štěpení LexA represoru (Little *et al.*, 1980), hlavního regulátoru SOS odpovědi, a tím umožní transkripci *tisAB-istR* TA lokusu (Dörr *et al.*, 2010).

Toxin TisB, produkt genu *tisB*, je 29 aminokyselin dlouhý, amfifilní, alfa-helikální monomer, který se v cytoplazmatické membráně skládá do stabilního dimeru a vytváří póry (Steinbrecher *et al.*, 2012). Podle této studie je stabilita dimeru zajištěna elektrostatickým nábojovým zipem, což je zcela nový koncept pro protein-proteinové interakce v membránách. TisB toxin selektivně propouští hydroxylové anionty přes membránu, což pravděpodobně způsobí narušení protonmotivní síly na membráně (Gurnev *et al.*, 2012) a vede ke snížení intracelulárního množství ATP (Unoson & Wagner, 2008). Nedostatek ATP vede jak k zastavení štěpení DNA inaktivací topoizomeráz, tak i k zastavení dalších buněčných procesů jako je replikace, transkripce a translace, což nakonec vede k MDT (Dörr *et al.*, 2010; Unoson & Wagner, 2008). *tisB* je jeden ze dvou toxinových genů, který je při samostatné deleci schopen způsobit pokles perzistence u *E. coli* (Dörr *et al.*, 2010).

Během neaktivní SOS odpovědi je transkripce *tisAB-istR* lokusu inhibována LexA represorem a syntéza TisB toxinu je inhibována i na úrovni mRNA antitoxinem IstR-1. sRNA antitoxin IstR-1 je



transkribován pod kontrolou vlastního LexA nezávislého promotoru a váže se na „standby“ oblast *tisAB* mRNA (+42) (viz níže), čímž brání translaci po náhodné transkripci *tisAB* lokusu během neaktivní SOS odpovědi. Po derepresi *tisAB-istR* lokusu je koncentrace IstR-1 převýšena vysokou koncentrací *tisAB* mRNA, což vede k expresi TisB toxinu. Sekvence *IstR-1* genu o velikosti 75 nt i jeho 5' nepřekládaná oblast (5' UTR), je obsažena ve větším, 140 nt dlouhém genu *IstR-2*, který je ovšem stejně jako *tisAB* pod kontrolou LexA dependentního promotoru a v regulaci translace *tisB* mRNA se neuplatňuje (Darfeuille *et al.*, 2007; Vogel *et al.*, 2004).



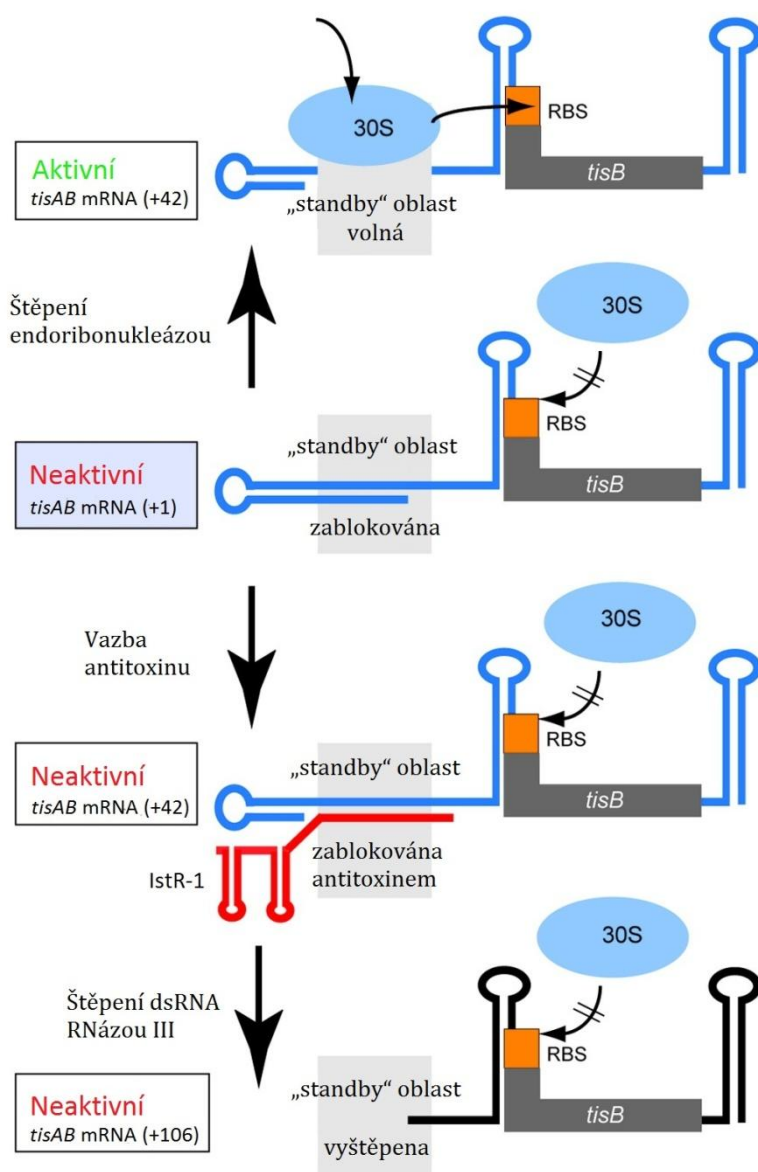
Obr. 5: Srovnání exprese *tisAB-istR* lokusu při aktivní a neaktivní SOS odpovědi. Při aktivní SOS odpovědi se v buňce nacházejí tři varianty *tisAB* mRNA a dva produkty lokusu *istR*. Při neaktivní SOS odpovědi je na LexA boxu vázán LexA represor a k syntéze primárních transkriptů, jejichž promotory jsou pod kontrolou právě LexA represoru, nedochází. K transkripci genu *istR-1*, který je pod kontrolou LexA nezávislého promotoru dochází jak při aktivní, tak i při neaktivní SOS odpovědi (převzato a upraveno z Wagner and Unoson, 2012).

Během SOS odpovědi je gen *tisA* transkribován společně s genem *tisB* do jednoho primárního transkriptu *tisAB* mRNA (+1), ale *tisA* na rozdíl od *tisB* už není dále překládán (viz níže). Existují tři varianty *tisAB* mRNA (viz Obr. 5). Z primárního transkriptu *tisAB* mRNA (+1) se rozdílnými mechanismy vytváří zkrácené transkripty *tisAB* mRNA (+42) a *tisAB* mRNA (+106) (viz níže). Čísla v závorkách označují pozici 5' konce na primárním transkriptu, 3' konec je sdílen všemi třemi variantami (Darfeuille *et al.*, 2007; Vogel *et al.*, 2004).

Proteosyntéza toxinu TisB probíhá pouze na *tisAB* mRNA (+42), která vzniká z primárního transkriptu po odštěpení duplexové RNA struktury na začátku primárního transkriptu endoribonukleázou. Regulace nasednutí ribozomu je vysvětlována na základě ribozom „standby“ modelu (viz Obr. 6) (de Smit & van Duin, 2003). 30S podjednotka ribozomu nemůže přímo nasednout na *tisB* RBS, jelikož všechny tři varianty *tisAB* mRNA tvoří v této oblasti stabilní sekundární strukturu. 30S podjednotka ribozomu ale nasedá na „standby“ oblast *tisAB* mRNA (+42) a čeká na přechodné

rozvolňování sekundárních struktur tvořících se před a přes *tisB* RBS, až na ni nakonec „sklouzne“ a začíná translace (Darfeuille *et al.*, 2007).

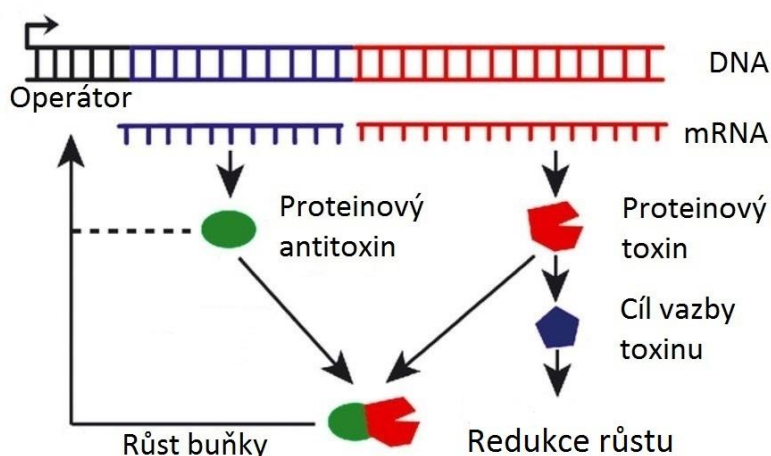
Na *tisAB* mRNA (+1) a *tisAB* mRNA (+106) translace neprobíhá. *tisAB* mRNA (+1) tvoří přes „standby“ oblast sekundární strukturu, která brání nasednutí ribozomu. *tisAB* mRNA (+106) vzniká vyštěpením „standby“ oblasti RNázou III po navázání antisense sRNA antitoxinu IstR-1 právě na „standby“ oblast *tisAB* mRNA (+42) (viz Obr. 6).



Obr. 6: Ribozom „standby“ model. Stabilní sekundární struktura brání nasednutí ribozomu na RBS všech třech variant *tisB* mRNA. Jednotlivé *tisAB* mRNA vznikají různými mechanismy a pouze *tisAB* mRNA (+42) má volnou „standby“ oblast k nasednutí ribozomu (převzato a upraveno z Wagner & Unoson, 2012).

## 4.2. Toxin-antitoxin systémy typu II

U TA systémů typu II je proteinový toxin neutralizován proteinovým antitoxinem prostřednictvím protein-proteinových interakcí. Toxin i antitoxin leží v jednom operonu, ve kterém jsou společně transkribovány a následně překládány. Za normálních okolností tvoří oba proteinové produkty netoxický komplex. Antitoxiny jsou ovšem během stresových podmínek degradovány buněčnými proteázami, čímž dochází k aktivaci toxinů. Antitoxiny mají jednak doménu pro protein-proteinové interakce, tak i DNA-vazebnou doménu. Vytvoření proteinového páru vede jak k přímé deaktivaci toxinu, tak většinou i k navázání komplexu toxin-antitoxin na promotor, kde reprimuje expresi daného operonu. Geny pro antitoxiny jsou většinou umístěny proti směru transkripce od genů pro toxiny, aby jejich exprese byla v nadbytku nad toxinovou.



Obr. 7: Schéma mechanismu účinku toxin-antitoxin systémů typu II. Navázání toxinu na svůj cíl vede k redukcí růstu buňky. Vazba příslušného proteinového antitoxinu na toxinový protein vede k inhibici aktivity toxinu. Antitoxin, ale i komplex toxinu a antitoxinu se ve většině případů vážou na operátor a reprimují transkripci operonu (převzato a upraveno z Wen *et al.*, 2014).

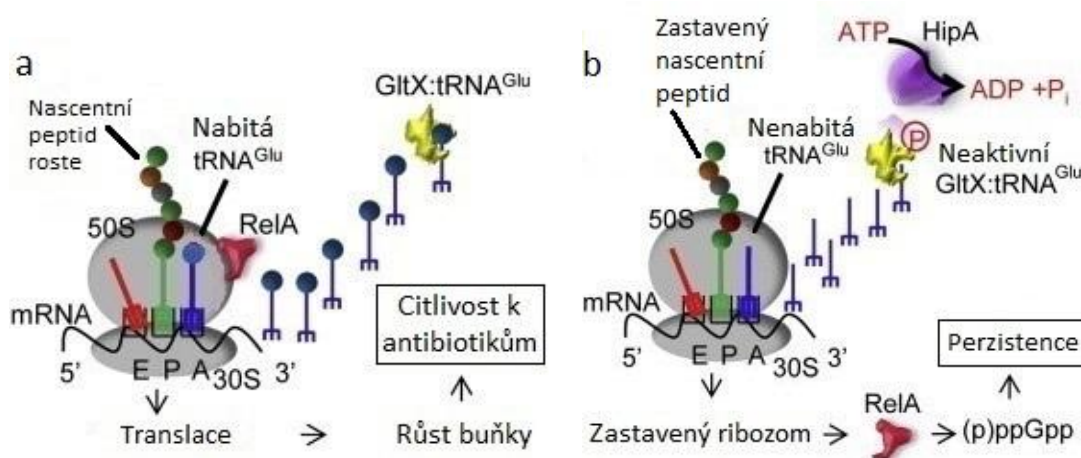
### 4.2.1. HipBA toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie *E. coli*

Gen *hipA* byl první objevený genetický determinant perzistence (Moyed & Bertrand, 1983). Proti směru transkripce od genu *hipA*, který kóduje proteinový toxin HipA, leží gen *hipB*, kódující proteinový antitoxin HipB. Za normálních okolností jsou oba geny společně transkribovány a následně i překládány. Otevřený čtecí rámec (ORF) genu *hipB* je 264 nt dlouhý a poslední nukleotid stop kodonu je i první nukleotid iniciačního kodonu 1320 nt dlouhého ORF genu *hipA* (Black *et al.*, 1991). To nasvědčuje tomu, že se stejně jako i u jiných TA systémů typu II uplatňuje při translaci mechanismus translačního spřažení, který zajišťuje rovnoměrnou expresi obou genů. Výsledný produkt genu *hipA* je 440 aminokyselin dlouhá serin/threonin-protein kináza HipA, patřící mezi fosfatidylinositol 3-/4- kinázy (Black *et al.*, 1991; Correia *et al.*, 2006).

Během stresových podmínek dochází k degradaci HipB antitoxinu Lon proteázou, která rozpoznává nestrukturovaný C-terminus antitoxinu a dochází k aktivaci HipA toxinu (Hansen *et al.*, 2012). Na základě *in vitro* experimentů bylo naznačeno, že HipA toxin inhibuje translaci fosforylací translačního faktoru EF-Tu (Schumacher *et al.*, 2009). To ovšem nevysvětlovalo, proč po aktivaci HipA, dochází k inhibici replikace a transkripce. Exprese HipA toxinu navíc vedla ke stimulaci RelA-dependentní syntézy alarmonu (p)ppGpp, což značí pravděpodobné uplatnění dalších faktorů (Bokinsky *et al.*, 2013). Podle dvou recentních nezávislých studií však není fosforylace EF-Tu hlavní příčina perzistence, a prokazují, že translace je inhibována fosforylací glutamyl-tRNA syntetázy (GltX) na Ser<sup>239</sup> v ATP-vazebném místě (Germain *et al.*, 2013; Kaspy *et al.*, 2013). Za normálních okolností je GltX aktivní a aktivita RelA je inhibována vazbou na 50S podjednotku ribozomu (viz Obr. 8a). Jakmile se HipA toxin aktivuje, fosforyluje mimo jiné i GltX a dochází k inhibici její aminoacylové aktivity a nahromadění deacylované tRNA<sup>Glu</sup>. To vede ke vstupu deacylované tRNA<sup>Glu</sup> do A-místa ribozomu, čímž dochází k aktivaci stringentní odpovědi, tedy uvolnění RelA z ribozomu a RelA-dependentní syntéze alarmonu (p)ppGpp (viz Obr. 8b). (p)ppGpp následně inhibuje DNA replikaci (Maciąg *et al.*, 2010), translaci (Svitil *et al.*, 1993) či syntézu fosfolipidů (Heath *et al.*, 1994) a vede k MDT. Velmi nedávno publikovaná studie ukázala, že HipA-indukovaná perzistence nezávisí pouze na samotném inhibičním účinku (p)ppGpp, ale i na dalších faktorech, TA systémech typu II kódujících endoribonukleázy, aktivitě Lon proteázy a koncentraci polyfosfátů. Bez aktivace těchto TA systémů není HipA toxin schopen indukovat perzistenci (Germain *et al.*, 2015). Mechanismus jakým HipA toxin indukuje ostatní TA systémy regulací koncentrace (p)ppGpp, by mohl vysvětlovat model zmíněný v kapitole 3.2 (viz Obr. 3). HipA toxin je schopný sám se inaktivovat autofosforylací na Ser<sup>150</sup> v ATP-vázající doméně, což je možná jeden z klíčových kroků v ukončení perzistentního stavu (Schumacher *et al.*, 2012).

Účinek toxinu je za normálních okolností neutralizován 88 aminokyselin dlouhým proteinovým antitoxinem HipB. HipB je Cro-like DNA-vazebný transkripční represor, který druhou doménou interaguje s HipA toxinem. Antitoxin samotný či účinněji v komplexu s toxinem negativně reguluje transkripci *hipBA* operonu vazbou na čtyři regulační operátory s konsenzuálními sekvencemi TATCCN<sub>8</sub>GGATA v promotorové oblasti (N značí jakýkoliv nukleotid) (Black *et al.*, 1994, 1991). Při represí transkripce se nejdříve HipB dimer s „helix-turn-helix“ motivem váže do velkého žlábků DNA a poté dvě molekuly HipA obklopí HipB-DNA komplex (Black *et al.*, 1994; Schumacher *et al.*, 2009). Interakce HipA toxinu s HipB antitoxinem se liší od jiných TA systémů. N-koncové domény dvou HipA toxinů interagují s jednou podjednotkou HipB dimeru, zatímco C-terminální domény HipA toxinů interagují s druhou podjednotkou HipB dimeru. HipB antitoxin však výrazně neovlivňuje aktivní místo toxinu HipA. HipB pravděpodobně neutralizuje HipA tak, že zabrání jeho konformační změně při navázání proteinového substrátu (Schumacher *et al.*, 2009). Nedávná studie prokázala významnou

roli HipA toxinu při tvorbě biofilmu, kontrolou uvolňování extracelulární DNA, která tvoří složku biofilmu (Zhao *et al.*, 2013).



Obr. 8: (a) Toxin HipA je neutralizován HipB antitoxinem. GltX není fosforylována a translace může probíhat normálně. (b) Aktivovaný HipA toxin fosforyluje GltX, což způsobí inhibici její aminoacylové aktivity. Dochází k hromadění nenabitě tRNA<sup>Glu</sup>, která se nakonec váže do A-místa ribozomu a aktivuje RelA. RelA se uvolní z ribozomu a syntetizuje (p)ppGpp, který dále navodí perzistenci (převzato a upraveno z Germain *et al.*, 2013).

#### 4.2.2. RelBE toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie *E. coli*

Další TA systém typu II, uplatňující se v perzistenci je kódován lokusem *relBE*. Gen *relE* kóduje 95 aminokyselin dlouhý proteinový toxin RelE, zatímco gen *relB*, ležící v protisměru transkripce od *relE*, kóduje 79 aminokyselin dlouhý proteinový antitoxin RelB (Gotfredsen & Gerdes, 1998). RelE je mRNA interferáza (Overgaard *et al.*, 2008), která působí jako globální inhibitor translace během nutričního stresu, konkrétně při nedostatku aminokyselin či glukózy (Christensen *et al.*, 2001). RelE toxin může být také aktivován signalizací zatím necharakterizovanou extracelulární, termolabilní látkou během velké hustoty buněk v populaci (Tashiro *et al.*, 2012).

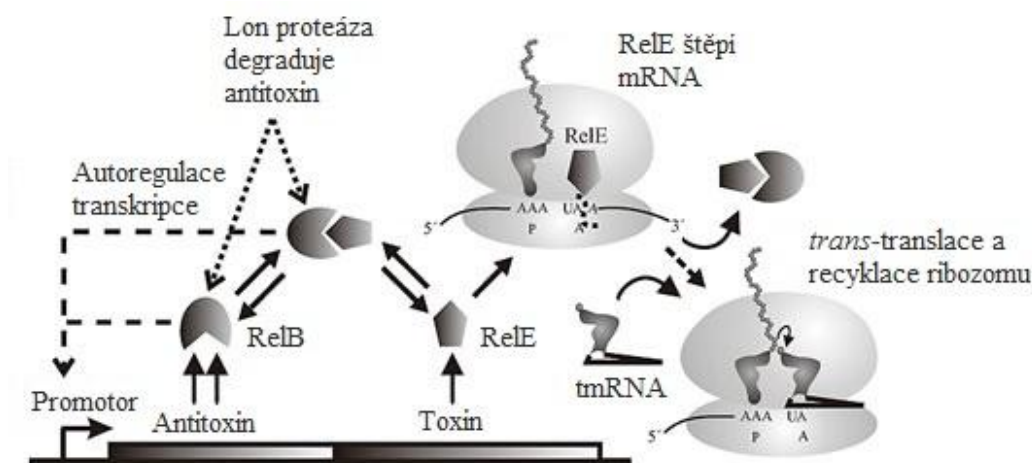
Během nutričního stresu je indukována degradace RelB antitoxinů Lon proteázami, čímž dochází k aktivaci RelE toxinů. Na rozdíl od HipA toxinu, RelE-indukovaná MDT perzisterů nezávisí na aktivaci (p)ppGpp syntetáz RelA a SpoT, a tudíž nezávisí ani na samotném alarmonu (p)ppGpp (Christensen *et al.*, 2001).

Aktivní RelE toxin se váže do A-místa na ribosomech, kde štěpí na ribozom navázanou mRNA (Pedersen *et al.*, 2003). Podle této studie je endoribonukleázová aktivita RelE toxinu kodon specifická a štěpí na stop kodonech mezi druhým a třetím nukleotidem. Novější studie však ukazuje, že štěpení RelE toxinem je kodon nespecifické, ovšem stále probíhá převážně mezi druhým a třetím nukleotidem kodonu, s preferencí štěpit před purinem (Goeders *et al.*, 2013).

Po naštěpení molekuly mRNA RelE toxinem, zůstává 5' část mRNA navázaná na peptidyl-tRNA v P-místě ribozomu jako peptidyl-tRNA:mRNA komplex. Po neutralizaci RelE toxinu antitoxinem RelB

dochází k rychlému obnovení translace. Hlavní úlohu při tom zaujímá tmRNA, která „osvobodí“ zastavený ribozom od naštěpené mRNA (Christensen & Gerdes, 2003).

tmRNA má rysy jak tRNA, tak i mRNA a kromě uvolnění naštěpené mRNA z ribozomu dokáže označit značkou pro proteolýzu peptid, který byl na ribozomu syntetizován ještě před rozštěpením mRNA toxinem RelE. tmRNA obsahuje doménu, která se sekvenčně podobá části tRNA<sup>Ala</sup> a dochází k její aminoacylaci na 3'-CCA konci. Zároveň tmRNA obsahuje krátkou část mRNA, kódující značkovací sekvenci ANDENYALAA. tmRNA vstupuje do uvolněného A-místa na zastaveném ribozomu a přidáním alaninu na nascentní peptid začíná *trans*-translace. Tímto se uvolní zastavený ribozom od poškozené mRNA. Místo původní mRNA působí jako mRNA sekvence na tmRNA, na kterou se váží další odpovídající aminoacyl-tRNA molekuly a pokračuje syntéza proteolytické značky na nascentní peptid. ANDENYALAA značka je následně rozeznána specifickými proteázami a peptid je degradován (převzato z Christensen & Gerdes, 2003). Buňky postrádající tmRNA vykazují větší RelE toxicitu. tmRNA může být během translace také štěpena RelE toxinem (Christensen & Gerdes, 2003).



Obr. 9: Schéma organizace a regulace *relBE* TA operonu. Vazba RelE toxinu do A-místa ribozomu indukuje štěpení mRNA mezi druhým a třetím nukleotidem kodonu. Po neutralizaci RelE toxinu antitoxinem RelB dochází k „osvobození“ ribozomu od rozštěpené mRNA za pomoci tmRNA a následně probíhá *trans*-translace (převzato a upraveno z Pedersen *et al.*, 2003).

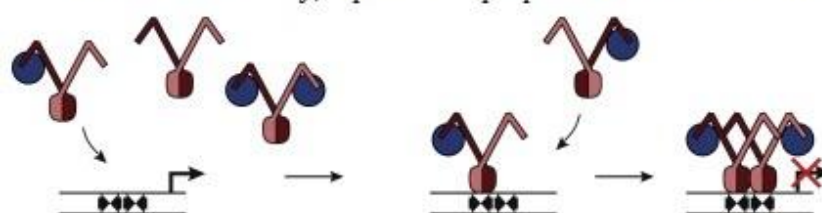
Aktivita RelE toxinu je neutralizována antitoxinem RelB, který způsobí konformační změnu aktivního místa toxinu (Li *et al.*, 2009). RelB antitoxin tvoří RelB<sub>2</sub> dimer a sám je schopen reprimovat transkripci *relBE* operonu (Li *et al.*, 2008). Účinnější je však v komplexu s RelE toxinem, který funguje jako korepresor (Gotfredsen & Gerdes, 1998). Dva dimery RelB<sub>2</sub> s „ribbon-helix-helix“ motivem (Li *et al.*, 2008) se váží na dvě vazebná místa na operátoru o délce 166 nukleotidů (Overgaard *et al.*, 2008).

Zdali bude transkripce *relBE* operonu aktivní či neaktivní závisí na poměru RelB:RelE spíše nežli na absolutní koncentraci příslušných proteinů. Při poměru RelB:RelE větším než 2:1, RelE toxin

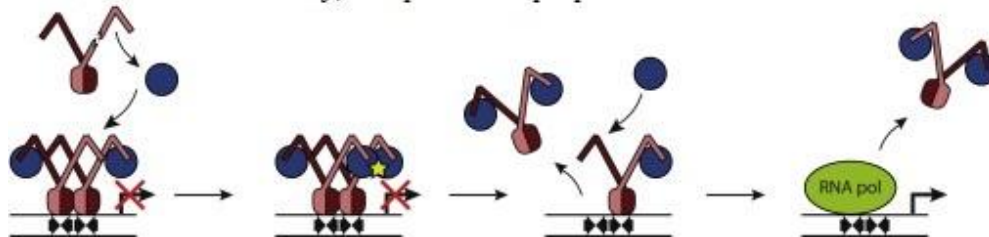


zvyšuje kooperativní vazbu RelB<sub>2</sub> dimeru na *relO*<sub>166</sub> operátor a zvyšuje stabilitu RelB<sub>2</sub>-DNA komplexu. Represorový komplex se poté skládá ze dvou heterotrimerů RelB<sub>2</sub>-RelE tvořící RelE-RelB<sub>2</sub>-RelB<sub>2</sub>-RelE heterohexamerní komplex vázaný na obě vazebná místa *relO*<sub>166</sub> operátoru. Po degradaci RelB antitoxinu Lon proteázou během nutriční limitace se nahromadí volný RelE toxin. Při poměru RelB:RelE menším než 2:1, se RelE váže na volné C-konce RelB antitoxinů jednotlivých heterotrimerů RelB<sub>2</sub>-RelE a vytváří RelB<sub>2</sub>-RelE<sub>2</sub> komplex, který není schopen vazby na DNA a postupně se oba RelB<sub>2</sub>-RelE<sub>2</sub> komplexy uvolní z operátorové části DNA (viz Obr. 10 dole). RelE toxin tedy při zvýšené koncentraci funguje též jako derepresor transkripce *relBE* operonu (Bøggild *et al.*, 2012; Overgaard *et al.*, 2008).

Normálně rostoucí buňky, represe *relO* při poměru RelB:RelE větším než 2:1



Nutričně limitované buňky, dereprese *relO* při poměru RelB:RelE menším než 2:1



Obr. 10: (nahore) Koncentrace antitoxinu RelB je v rostoucích buňkách v určitém poměru větší než koncentrace toxinu RelE. Nejdříve se RelE toxin váže na RelB<sub>2</sub> dimer a dochází k vazbě prvního RelB<sub>2</sub>-RelE heterotrimeru na *relO*<sub>166</sub> operátor. RelB<sub>2</sub>-RelE heterotrimer se naváže na jedno vazebné místo a poté se na druhé vazebné místo daleko snadněji naváže i druhý heterotrimer za vytvoření RelE-RelB<sub>2</sub>-RelB<sub>2</sub>-RelE heterohexamerního komplexu a dochází k represi transkripce. (dole) Množství volného RelE toxinu se po degradaci antitoxinů během nutriční limitace zvyšuje. RelE se poté postupně váže na C-terminální domény antitoxinů RelB v RelE-RelB<sub>2</sub>-RelB<sub>2</sub>-RelE heterohexameru a postupně dochází k odpoutání prvního a pak za pravděpodobné pomoci RNAP i druhého heterotrimeru z operátorového místa na DNA (převzato a upraveno z Bøggild *et al.*, 2012).

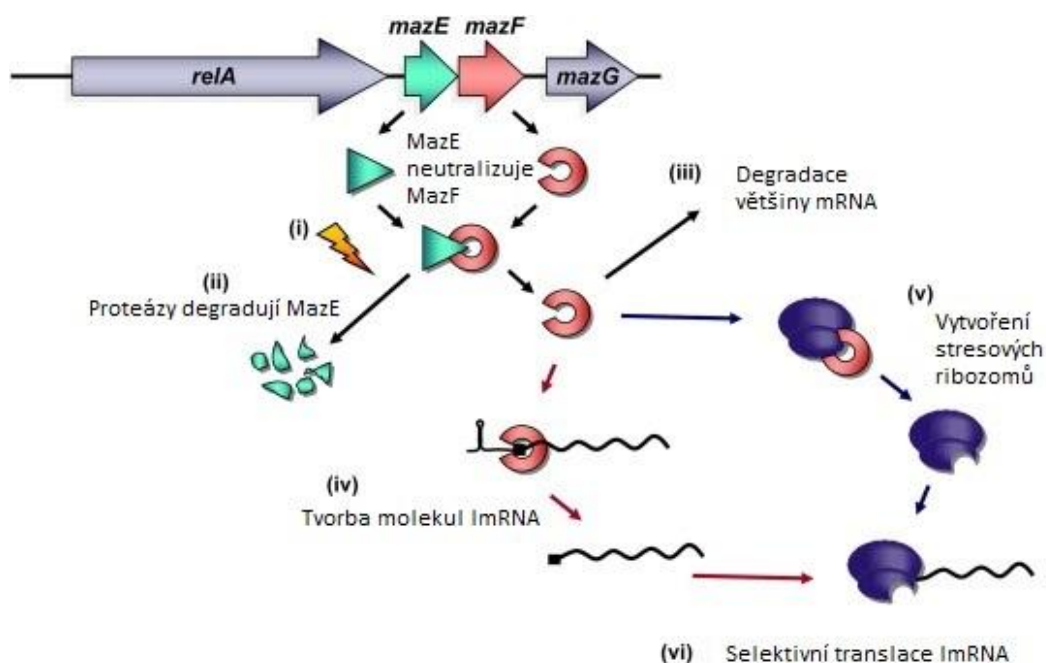
Autoreprese transkripce *relBE* operonu, ale i represe transkripce u ostatních TA systémů, která je citlivá ke správnému poměru koncentrací toxin:antitoxin, je nazývána „podmíněná kooperativita“. Takový mechanismus může sloužit k rychlému snížení množství volného toxinu v perzistentních buňkách a navrácení z perzistentního do rostoucího stavu nebo může sloužit i k snížení množství volného toxinu v rostoucích buňkách a zabránit tak náhodnému indukování perzistentního stavu v příznivých podmínkách (Cataudella *et al.*, 2012).

#### 4.2.3. MazEF toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie *E. coli*

Proti směru transkripce od genu *mazF*, který kóduje 111 aminokyselin dlouhý proteinový toxin MazF, leží gen *mazE*, kódující 82 aminokyselin dlouhý proteinový antitoxin MazE. Během stresových podmínek dochází k degradaci volného či na antitoxin vázaného antitoxinu MazE proteázami ClpAP a Lon (Aizenman *et al.*, 1996; Tripathi *et al.*, 2014).

MazF je sekvenčně specifická endoribonukleáza, štěpící ssRNA na 5' konci fosfodiesterové vazby mezi prvním A a C nukleotidy v ACA sekvenci. Na rozdíl od toxinu RelE je endoribonukleázová aktivita toxinu MazF nezávislá na ribozomu (Zhang Y. *et al.*, 2005, 2003). Tyto studie naznačily, že je inhibována proteosyntéza veškerých buněčných proteinů.

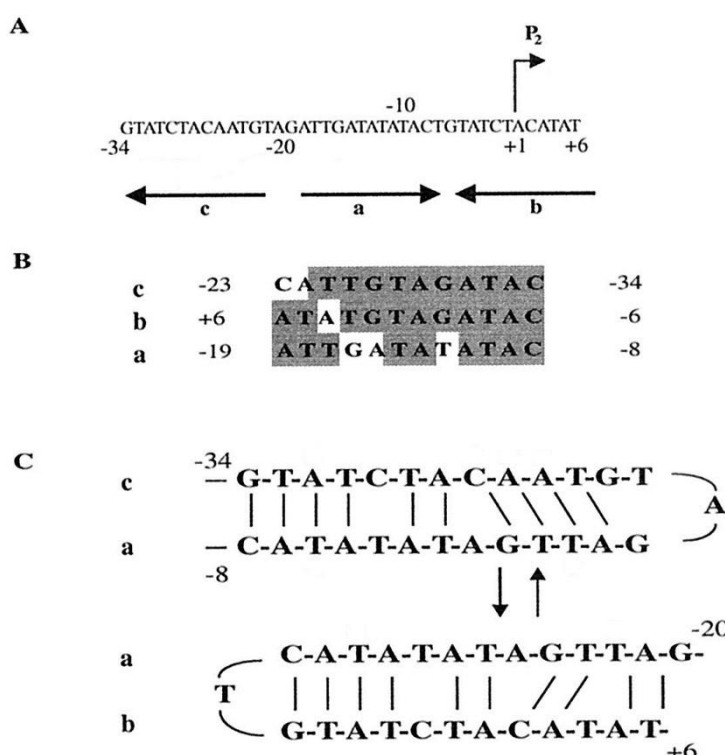
U *E. coli* však není proteosyntéza kompletně zablokována (viz Obr. 11). Dochází k selektivní syntéze specifických proteinů, které se zřejmě podílí na přežití malé frakce populace během stresových podmínek. Jsou to proteiny jako DeoC, účastníci se katabolismu deoxyribonukleosidů, či RsaA, katalyzující pseudouridylaci na pozici 516 v 16S rRNA (Amitai *et al.*, 2009). MazF toxin štěpí ACA sekvence specifických mRNA v blízkosti a v protisměru transkripce od AUG start kodonu tak, že odstraňuje 5' UTR těchto mRNA a dává vzniknout ImRNA. Aby však mohlo dojít k překladu ImRNA, musí MazF vyštěpit 43 nt z 3' konce 16S rRNA na 30S ribozomální podjednotce obsahující anti-Shine-Dalgarno sekvenci (aSD), která je potřebná k iniciaci translace běžných mRNA. Následně se vytváří speciální translační mašinerie nazvaná jako „stresové-ribozomy“, které selektivně překládají molekuly ImRNA vytvořené toxinem MazF (Vesper *et al.*, 2011).



Obr. 11: Během stresových podmínek (i) dochází k degradaci MazE antitoxinu proteázami (ii). MazF toxin poté degraduje většinu mRNA v buňce (iii). Dále je MazF schopen odstranit 5'UTR specifických mRNA, což vede k vytvoření ImRNA (iv). Aby mohla být ImRNA překládána za účelem vytvořit pro danou situaci specifické proteiny (vi), musí MazF v 30S podjednotce ribozomu naštěpit 16S rRNA obsahující aSD sekvenci (v) (převzato a upraveno z Vesper *et al.*, 2011).



Transkripce operonu *mazEF* je negativně autoregulována jak samotným dimerem MazE, tak i komplexem MazF<sub>2</sub>-MazE<sub>2</sub>-MazF<sub>2</sub> (Kamada *et al.*, 2003). Jeden model předpokládá, že se na této negativní autoregulaci podílí neobvyklá struktura operátoru nazvaná alterující palindrom. Je to komplikovaná struktura, kterou lze rozdělit na tři fragmenty „c“, „a“ a „b“ (viz Obr. 12). Fragment „a“ může párovat s fragmentem „c“, stejně tak jako s fragmentem „b“, ale „b“ nemůže párovat s „c“. Alterující palindrom poté může existovat buď v nespárované formě „c-a-b“, nebo ve formě „c-a“ či „b-a“ duplexu. Na „c-a-b“ formu se může vázat a reprimovat transkripci jak MazE dimer, tak i MazE-MazF komplex. Na fragmenty „c-a“ a „b-a“ se váže pouze komplex a inhibice transkripce je asi 5x účinnější. Na *mazEF* operon se také může vázat protein FIS, který naopak promotor aktivuje (Marianovsky *et al.*, 2001). Přesný mechanismus autoregulace *mazEF* operonu však stále není znám.



Obr. 12: (A) Jednotlivé palindromické fragmenty *mazEF* operátoru. (B) Sekvenční alingment jednotlivých palindromů. (C) Hypotetické sekundární struktury vytvořené vazbou palindromických sekvencí (převzato a upraveno z Marianovsky *et al.*, 2001).

Během nedostatku aminokyselin, je transkripce *mazEF* operonu inhibována také alarmonem (p)ppGpp, který je produkován (p)ppGpp syntetázou RelA, což brání *de novo* syntéze MazEF TA systému (Aizenman *et al.*, 1996). Toxin MazF mohou aktivovat i některá antibiotika, ale nezávisle na RecA, a tedy nezávisle na SOS odpovědi (Tripathi *et al.*, 2014).

Podle jedné recentní studie, MazF preferenčně štěpí mRNA v oblasti kódující antitoxiny různých TA systémů, zatímco oblast kódující toxin nechávají nepoškozenou. To vede k aktivaci mnoha různých TA systémů, které se můžou podílet na MazF-indukované perzistenci (Kasari *et al.*, 2013).

#### 4.2.4. MqsRA toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie *E. coli*

Gen *mqsR*, kódující toxin MqsR (Yamaguchi *et al.*, 2009), je jedním z nejsilněji exprimovaných genů perzisterů (Shah *et al.*, 2006). MqsR je 98 aminokyselin dlouhá mRNA interferáza, specificky štěpící mRNA v kodonech 5'-GCU-3', které jsou obsaženy ve 4212 ORF ze 4226 ORF genomu *E. coli* a svojí aktivitou kompletně inhibuje proteosyntézu (Yamaguchi *et al.*, 2009). V menší míře dokáže MqsR štěpit mRNA i v kodonech 5'-GCA-3' (Christensen-Dalsgaard *et al.*, 2010). Podle (Wang *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2009) je ribonukleázová aktivita toxinu MqsR, alespoň *in vitro*, na ribozomu nezávislá, ale podle jiných studií je MqsR aktivita, na základě homologie s RelE toxinem, ribozom-dependentní (Brown *et al.*, 2009; Christensen-Dalsgaard *et al.*, 2010). MqsR je spolu s TisB toxinem jediný toxin, který je při deleci jeho genu schopen snížit perzistenci (Kim & Wood, 2010). MqsR toxin však není sám o sobě dostatečný k navození perzistence. Spolu s genem *mqsR* leží v *mqsRA* operonu gen *mqsA*, kódující 131 aminokyselin dlouhý antitoxin MqsA, který inhibuje endoribonukleázovou aktivitu MqsR toxinu (Yamaguchi *et al.*, 2009).

Toxin MqsR je schopný štěpit i mRNA molekuly *mqsR* a *mqsA*, čímž může regulovat svojí vlastní aktivitu. Po odeznění stresových podmínek je štěpení *mqsR* mRNA možná jeden z klíčových kroků ukončení perzistence (Brown *et al.*, 2013). Naopak během stresových podmínek je MqsR schopný štěpit v *ghoS* oblasti na *ghoST* mRNA, což znemožní neutralizaci GhoT toxinu, který zvyšuje perzistenci bakterií *E. coli* (viz kapitola 4.3.1). MqsR toxin neštěpí *ghoT* transkript, jelikož je to jeden z mála transkriptů u *E. coli*, který neobsahuje 5'-GCU-3' kodon (Wang *et al.*, 2013).

Antitoxinový gen *mqsA* leží ve směru transkripce až za toxinovým genem *mqsR*. Geny *mqsR* a *mqsA* dělí pouze jeden pár bází, což poukazuje na uplatnění translačního spřažení (Yamaguchi *et al.*, 2009). *mqsRA* promotor obsahuje dvě palindromická místa, na které se specificky váže dimer antitoxinu MqsA a reprimuje transkripci (Brown *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2009). MqsA<sub>2</sub> antitoxin rozpoznává tato místa přímým kontaktem a na základě vlastností jednotlivých bází v sekvenci se specificky váže. Tento mechanismus rozpoznávání je nazýván „direct readout“ (Brown *et al.*, 2011). Za normálních okolností interaguje MqsA<sub>2</sub> svými N-terminálními doménami s MqsR toxinem a vytváří MqsR-MqsA<sub>2</sub>-MqsR komplex, čímž přímo neutralizuje aktivitu MqsR toxinu (Brown *et al.*, 2009).

Antitoxin MqsA se liší od jiných antitoxinů typu II v mnoha aspektech. MqsA je na rozdíl od většiny antitoxinů větší než jeho odpovídající toxin (Yamaguchi *et al.*, 2009). Další rozdíl je v represi *mqsRA* promotoru. Zatímco u jiných antitoxinů typu II se na svůj promotor váže a reprimuje transkripci jak antitoxin samotný, tak i komplex toxinu a antitoxinu, represi *mqsRA* promotoru zajišťuje pouze MqsA<sub>2</sub>. MqsR-MqsA<sub>2</sub>-MqsR komplex je neschopný vazby na DNA a na represi transkripce *mqsRA* operonu se nepodílí (Brown *et al.*, 2013). MqsA s motivem „helix-turn-helix“ se na rozdíl od všech zatím důkladně prostudovaných antitoxinů typu II váže na promotor C-terminální

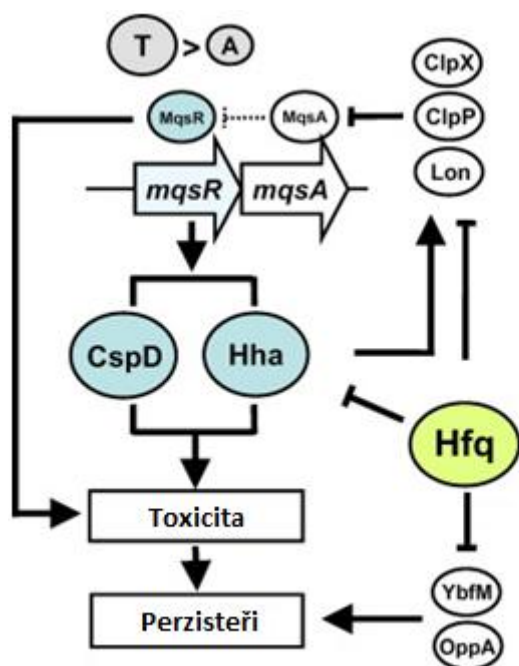
doménou, která zprostředkovává i dimerizaci antitoxinu. MqsA jako jediný antitoxin váže kov, konkrétně zinek, který se váže na N-terminální domény a stabilizuje strukturu dimerního antitoxinu MqsA<sub>2</sub>. Je to zatím co víme jediný antitoxin uplatňující se v perzistenci, který se kromě svého promotoru váže i na promotory jiných genů a reprimuje jejich transkripci (Brown *et al.*, 2009).

Jsou to geny ovlivňující fyziologii buňky *E. coli*, jako např. geny *cspD* (Kim *et al.*, 2010), *rpoS* (Wang *et al.*, 2011) či *csgD* (Soo & Wood, 2013), jejichž fyziologická úloha bude detailně popsána níže. Za určitých stresových podmínek dochází k degradaci MqsA antitoxinu proteázami ClpXP a Lon, čímž dochází k aktivaci toxinu a k derepresi jak *mqsRA* promotoru, tak i promotorů dalších reprimovaných genů (Kim *et al.*, 2010). Volný MqsR toxin funguje také jako destabilizátor komplexu MqsA-DNA a sám je schopný dereprimovat promotor (Brown *et al.*, 2013).

Po degradaci MqsA antitoxinu, dochází k indukci genu *cspD* (Kim *et al.*, 2010). CspD tvoří dimer, který vazbou na DNA inhibuje chromozomální replikaci (Yamanaka 2001), čímž se podílí na MqsR-indukované perzistenci. CspD může být také cílem pro Lon proteázy, které ho degradují v závislosti na růstové fázi populace. Tato regulovaná proteolýza je možná jedním z kroků v ukončení perzistence (Langklotz & Narberhaus, 2011).

Na indukci perzistence se po degradaci MqsA antitoxinu podílejí také geny *hha* a *hokA*. HokA však není, na rozdíl od CspD a Hha, pro MqsR-indukovanou perzistenci esenciální. Hha je transkripční modulátor, který je schopný indukovat expresi genů kódujících proteázy (*clpX*, *clpP* a *lon*). Aktivita produktů těchto několika výše zmíněných genů je na úrovni RNA negativně regulována malým RNA chaperonem Hfq (viz Obr. 13), který reguluje specifické molekuly RNA (Kim & Wood, 2010).

Chaperonem Hfq může být též nepřímo snížena tvorba perzisterů negativní regulací mRNA transportních proteinů vnější buněčné stěny jako YbfM a OppA. Na indukci perzistence se geny *oppA* a *ybfM*, kódující proteiny vnější membrány podílejí jiným mechanismem než TA systémy (Kim & Wood, 2010). OppA je podjednotka transportního proteinu oligopeptidů (Hogarth & Higgins, 1983), YbfM je porin transportující z extracelulárního do intracelulárního prostoru různé látky včetně antibiotik (Pagès *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2009).



Obr. 13: MqsR-indukovaná perzistence. CspD a Hha jsou nezbytné ke vzniku perzistence. Hfq negativně reguluje indukcí perzistence. → značí indukci, a ⊥ značí represi (převzato a upraveno z Kim & Wood, 2010).

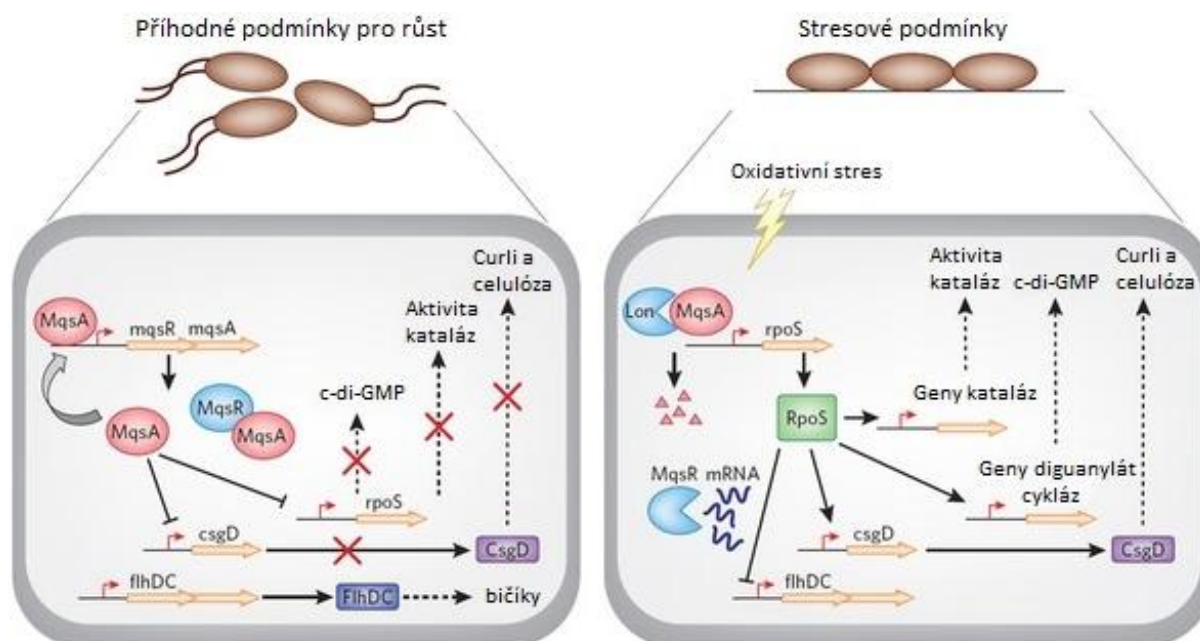
Po degradaci MqsA antitoxinu dochází dále k derepresi genu pro transkripční faktor *rpoS* a operon *csgDEFG*. Operon *csgDEFG* je poté přepisován RNA polymerázou obsahující RpoS sigma faktor, což je hlavní regulátor obecné stresové odpovědi

Operon *csgDEFG* kóduje část genů odpovědných za tvorbu a sekreci curli. Celý proces je zajištěn dalšími třemi geny nacházejícími se v operonu *csgBAC*. Geny *csgE*, *csgF* a *csgG* kódují membránové proteiny umožňující sekreci curli přes membránu, *csgB* a *csgA* kódují její strukturní podjednotky, které se skládají do vláken curli. Transkripce obou operonů je aktivována transkripčním regulátorem CsgD, jehož transkripce může být pozitivně regulována i molekulou c-di-GMP (Hammar *et al.*, 1995; Hengge, 2009).

RpoS kromě genu *csgD* transkripčně aktivuje i gen *adrA*, jehož produkt diguanylát cykláza AdrA syntetizuje c-di-GMP, který reguluje syntézu celulózy alosterickou aktivací enzymu celulóza syntáza (Da Re & Ghigo, 2006). Syntéza celulózy však může být regulována i za pomoci CsgD. RpoS dále mimo jiné aktivuje transkripci antioxidantních enzymů kataláz (Visick & Clarke, 1997).

Další role RpoS, která je regulována MqsRA TA systémem, je v rozhodování o přesmyku mezi planktonickým stavem a tvorbou biofilmu. Zda-li se buňka nachází v planktonním stavu či bude vytvářet biofilm, závisí na antagonistické regulaci RpoS a FlhDC (Wang *et al.*, 2011). Pokud buňka není vystavena stresujícím podmínkám, MqsA antitoxin se váže na promotory genu *rpoS*, a operonu *csgDEFG* a nedochází k jejich transkripci. Tím pádem nedochází prostřednictvím RpoS k indukci syntézy curli ani c-di-GMP. Zároveň však může probíhat transkripce hlavního regulonu buňky *flhDC*,

na který se MqsA antitoxin neváže. Buňka je poté pohyblivá a v planktonním stavu (viz Obr. 14 vlevo). Za stresových podmínek však dochází k degradaci MqsA antitoxinů, což vede k transkripci *rpoS*. RpoS indukuje geny *adrA* i *csgD* a reprimuje *flhDC*, což vede ke ztrátě motility a indukci tvorby biofilmu (viz Obr. 14 vpravo). Uvolněný MqsR toxin se může uplatňovat při štěpení již existujících mRNA, které se podílely na motilitě buňky.



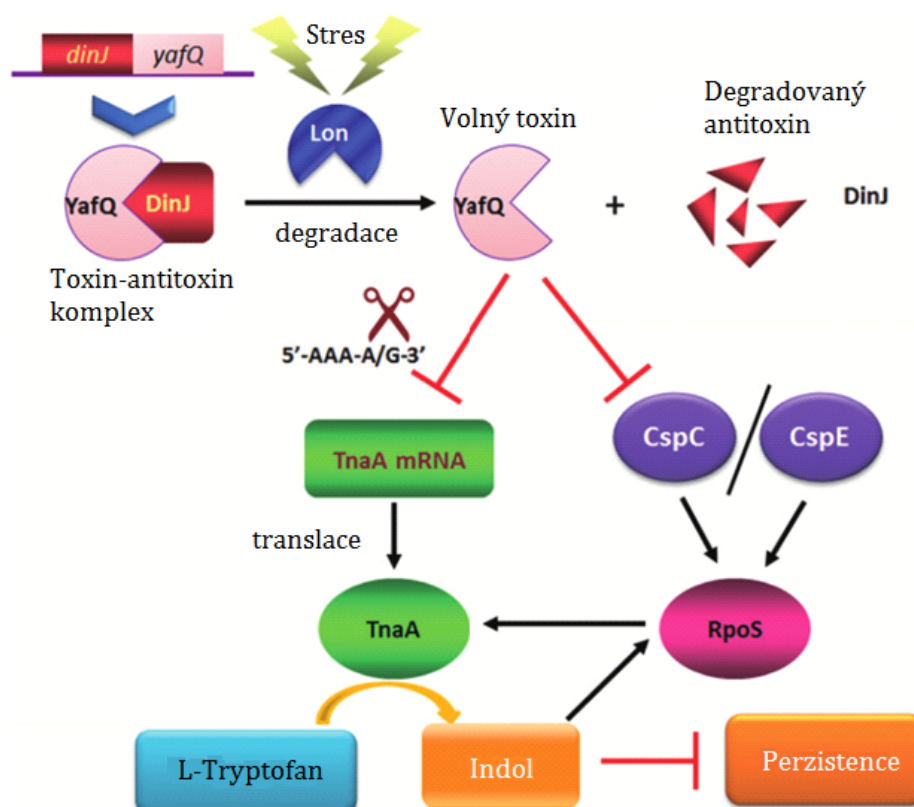
Obr. 14: (vlevo) Regulace motility buňky v příhodných podmínkách. MqsA antitoxin se váže na promotory několika genů a reprimuje transkripci. Represe transkripce se projevuje ve snížení množství c-di-GMP, curli a celulózy, i se sníží aktivita kataláz a dále se zvýší exprese bičičků. (vpravo) Regulace motility buňky při stresových podmínkách. Lon proteáza degraduje MqsA a dochází k expresi dereprimovaných genů. To se projevuje ve zvýšené syntéze c-di-GMP a curli s celulózou, ve zvýšené aktivitě kataláz a redukcii motility a tvorbě biofilmu. Volný MqsR toxin degraduje existující mRNA uplatňující se v motilitě buňky. → značí indukci, a ⊥ značí represi (převzato a upraveno z Hadjifrangiskou *et al.*, 2011).

#### 4.2.5. DinJ-YafQ toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie *E. coli*

Proti směru transkripce od genu *yafQ*, který kóduje 96 aminokyselin dlouhý proteinový toxin YafQ, leží gen *dinJ*, kódující 86 aminokyselin dlouhý proteinový antitoxin DinJ. Po degradaci DinJ antitoxinu Lon nebo ClpXP proteázou dochází k aktivaci YafQ toxinu.

YafQ toxin je sekvenčně a rámcově specifická endoribonukleáza, vážící se na 50S ribozomální podjednotku a narušující elongační fázi translace u většiny mRNA (Pryszak *et al.*, 2009). YafQ štěpí preferenčně kodony PuPuPu, nejčastěji AAA, mezi druhým a třetím nukleotidem, které se nacházejí v A-místě na ribozomu. Po naštěpení je mRNA uvolněna z ribozomu a rychle degradována (Armalyte *et al.*, 2012; Pryszak *et al.*, 2009). YafQ toxin preferenčně štěpí ssRNA a je schopen štěpit i bez vazby na ribozom. V *in vitro* denaturačních podmínkách je YafQ toxin schopen naštěpit i tRNA a 5S rRNA. Expresce YafQ vede k inhibici růstu, ale na rozdíl od jiných TA systémů jeho nadměrná produkce zřejmě nevede k usmrcení buňky (Armalyte *et al.*, 2012).

DinJ-YafQ TA systém se podobně jako MqsRA TA systém uplatňuje v regulaci obecné stresové odpovědi. Jeden z případů regulace YafQ toxinem je štěpení AAA kodonů na mRNA tryptofanázy TnaA (Hu *et al.*, 2015), která katalyzuje vznik indolu z L-tryptofanu (Lacour & Landini, 2004). YafQ dále posttranskripčně snižuje množství proteinů CspC a CspE (Hu *et al.*, 2015), které pozitivně regulují množství RpoS (Phadtare & Inouye, 2001) a RpoS pozitivně stimuluje TnaA. YafQ toxin tudíž přes redukci koncentrace RpoS a TnaA redukuje množství indolu, což vede ke zvýšení perzistence (viz Obr. 15) (Hu *et al.*, 2015). Tato studie je v rozporu se starší studií, která experimentálně prokázala, že signalizace indolem perzistenci zvyšuje (Vega *et al.*, 2012). Indol však také snižuje tvorbu biofilmu (Lee *et al.*, 2007).



Obr. 15: Během stresových podmínek je DinJ antitoxin degradován Lon proteázou. Volný toxin YafQ poté specificky štěpí mRNA tryptofanáz TnaA. YafQ dále nepřímo snižuje množství CspC a CspE proteinů, čímž posiluje redukci koncentrace TnaA. Po snížení množství TnaA dochází k redukci syntézy indolu, který za normálních okolností snižuje perzistenci. → značí indukci, a ⊥ značí represi (převzato a upraveno z Hu *et al.*, 2015).

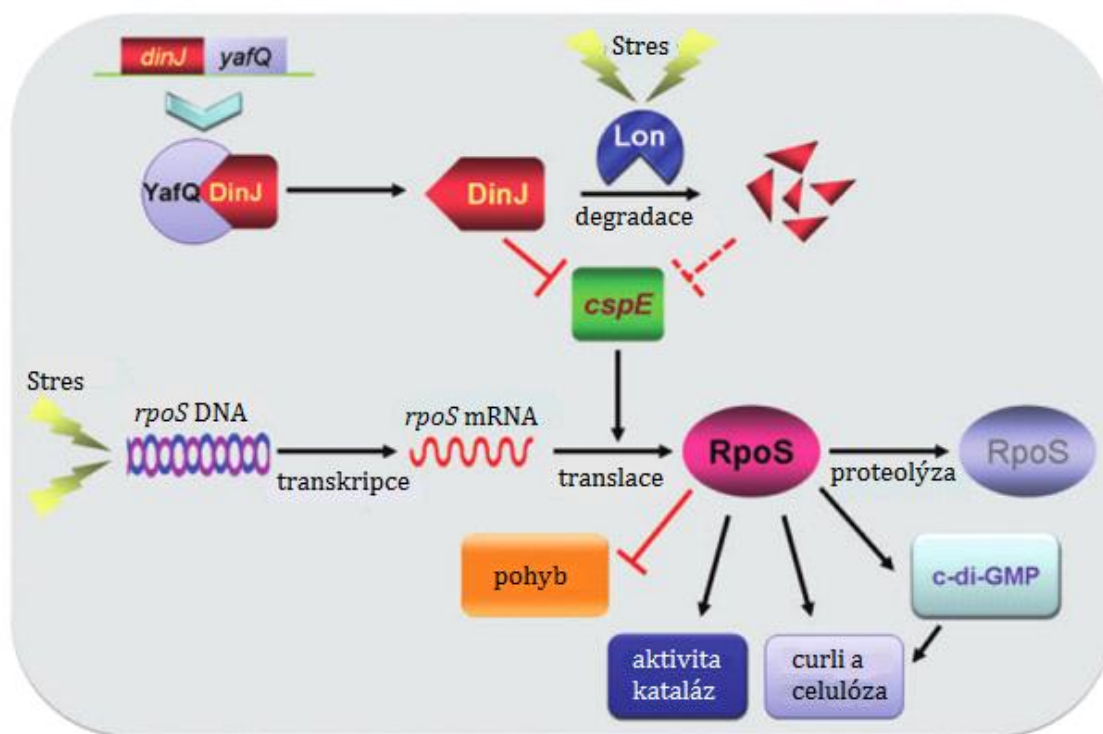
YafQ toxin je neutralizován DinJ antitoxinem. DinJ vytváří jak dimer  $\text{DinJ}_2$ , který je sám schopný represe transkripce *dinJ-yafQ* operonu, tak i YafQ-DinJ<sub>2</sub>-YafQ represorový komplex, který je v represi podobně účinný jako dimer antitoxinu DinJ (Liang *et al.*, 2014; Ruangprasert *et al.*, 2014).

DinJ<sub>2</sub> antitoxin dimerizuje N-terminální doménou a s motivem „ribbon-helix-helix“ se následně váže na DNA. C-terminální domény DinJ<sub>2</sub> se „obtáčejí“ okolo YafQ toxinu (Liang *et al.*, 2014;

Ruangprasert *et al.*, 2014). Po navázání na YafQ, dochází ke konformační změně v blízkosti katalytického místa YafQ (Liang *et al.*, 2014).

DinJ<sub>2</sub> i YafQ-DinJ<sub>2</sub>-YafQ komplex se váží na jedno ze tří nedokonalých, částečně překrývajících palindromických míst v promotoru (Liang *et al.*, 2014). Na druhé palindromické sekvenci se nachází LexA box pro LexA represor. Operon *dinJ-yafQ* je tedy aktivován jak při stringentní odpovědi tak i pravděpodobně při SOS odpovědi, což je mezi TA systémy unikátní proces regulace (Armalyte *et al.*, 2012). YafQ toxin na rozdíl od MqsR toxinu represorový komplex nedestabilizuje (Ruangprasert *et al.*, 2014).

DinJ antitoxin podobně jako MqsA antitoxin reprimuje transkripci i jiných genů než jen vlastní operon. DinJ se váže na promotor a reprimuje transkripci genu *cspE*, jehož produkt pozitivně reguluje množství RpoS. Během stresových podmínek kdy dochází k degradaci DinJ antitoxinu Lon proteázou, a dochází k transkripci genu *cspE*, je aktivována obecná stresová odpověď zvýšením translace *rpoS* mRNA. RpoS následně pozitivně stimuluje syntézu c-di-GMP, curli a celulózy, aktivuje katalázy a snižuje motilitu buňky (Hu *et al.*, 2012).



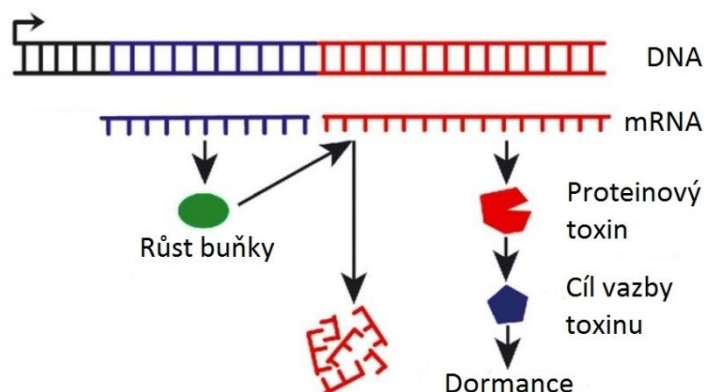
Obr. 16: Během stresových podmínek je DinJ degradován Lon proteázou a dochází k derepresi genu *cspE*. CspE vede ke zvýšení translace *rpoS* mRNA. RpoS následně zvyšuje koncentraci c-di-GMP, aktivitu kataláz, syntézu curli a celulózy a vede ke snížení motility buňky. → značí indukci, a ⊥ značí represi (převzato a upraveno z Hu *et al.*, 2012).

### 4.3. Toxin-antitoxin systémy typu V

Tento typ TA systémů byl objeven teprve nedávno a zatím je mu přiřazen pouze jeden TA systém uplatňující se v perzistenci. Toxin a antitoxin leží v jednom operonu a jsou společně



transkribování. Je to doposud jediný typ TA systémů, kde antitoxiny neutralizují toxiny štěpením toxinové mRNA (Wang *et al.*, 2012).



Obr. 17: Schéma mechanismu účinku toxin-antitoxin systémů typu V. Syntéza toxinu je přerušena antitoxinem, který štípe toxinovou mRNA (převzato a upraveno z Wen *et al.*, 2014)

#### 4.3.1. GhoST toxin-antitoxin systém v perzistenci bakterie *E. coli*

GhoT je 57 aminokyselin dlouhý, vysoce hydrofobní toxinový produkt genu *ghoT*. Funguje jako lytický peptid, který poškozuje buněčnou membránu a také ovlivňuje pohyblivost buňky a tvorbu biofilmu. Určitá míra poškození membrány toxinem GhoT zvyšuje perzistenci bakterií *E. coli*, ale při jeho nadměrné expresi dochází k lýze buněk, které jsou následně nazývány „ghost cells“ (Wang *et al.*, 2012). GhoT toxin má dvě transmembránové domény, ale přesný mechanismus kterým poškozuje membránu, zatím není znám (Wang *et al.*, 2012). Poškození membrány probíhá na pólech buňky a aktivita GhoT toxinu vede k poklesu protonmotivní síly a snížení intracelulárního množství ATP (Cheng *et al.*, 2014). To vede k redukci růstu a MDT.

Ve stejném operonu 27 páru bází proti směru transkripce od genu *ghoT* leží gen *ghoS*, kódující antitoxin GhoS, který neutralizuje GhoT toxin. GhoS antitoxin je velmi odlišný od ostatních antitoxinů. Je to 98 aminokyselin dlouhá, sekvenčně specifická endoribonukleáza schopná přerušit syntézu GhoT toxinu specifickým štěpením v hypotetických 5'-UNNU(A/C)N(A/G)(A/U)A(A/U)-3' místech v *ghoT* oblasti na *ghoST* transkribované mRNA. Neváže se na *ghoST* promotor, aby reguloval transkripci, netvoří dimery, a ani není nestabilní a náchylný k proteolytické degradaci během stresových podmínek (Wang *et al.*, 2012).

Produkce GhoT toxinu je regulována MqsR toxinem, který při stresových podmínkách štěpí v oblasti *ghoS* na *ghoST* mRNA. *ghoT* mRNA není štěpena, ačkoliv obsahuje i kodony 5'-GCA-3', které jsou také rozpoznávané, ale méně preferované MqsR toxinem. GhoST je první TA systém uplatňující se v perzistenci, který je regulovaný jiným TA systémem. Tato regulace svědčí o určité hierarchii TA systémů v buňce (Wang *et al.*, 2013).



## 5. Závěr

V posledním desetiletí se úsilí porozumět molekulárním mechanismům, které jsou odpovědné za perzistenci, výrazně zvýšilo. Navzdory tomuto úsilí však zůstává molekulární podstata perzistence stále velkou neznámou. Od objevení perzisterů byla za dostatečné vysvětlení MDT považována dormance. Recentní studie však rozdělily vědeckou komunitu na dva tábory, polemizující nad nezbytností dormance perzisterů k MDT.

Perzistence byla pozorována u mnoha druhů bakterií, avšak doposud byla převážně studována pouze u modelového organismu *E. coli*. Bakterie jako *M. tuberculosis*, *P. aeruginosa* či *S. aureus* se až teprve nyní začínají detailněji zkoumat. I po dekádě usilovného zkoumání toho však o vzniku bakteriální perzistence stále nevíme mnoho.

V této práci jsem poukázal na různé příčiny vzniku perzisterů a jejich heterogenitu. Rozdělil jsem heterogenní perzistery do dvou typů, které byly stanoveny podle způsobu vzniku perzisterů. Dále jsem shrnul mechanismy fungování několika TA systémů u bakterie *Escherichia coli*, jejichž toxinové části inhibují syntézu makromolekul, čímž redukují růst a pravděpodobně navozují dormanci a MDT perzistentních buněk. Poukázal jsem také na skutečnost, že některé TA systémy nemají v perzistenci roli pouhých inhibitorů syntézy makromolekul, ale uplatňují se také v regulaci různých fyziologických procesů jako je tvorba biofilmu či obecná stresová odpověď, které jsou indukovány ve stresových podmínkách. Nedávné studie navíc ukázali vzájemnou regulaci mezi TA systémy samotnými, což poukazuje na určitou hierarchii jednotlivých TA systémů.

Z mé práce vyplívají určité podobnosti i rozdíly v mechanismech toxicity a její regulaci u sedmi TA systémů bakterie *E. coli*, u kterých byl prokázán podíl na vzniku perzistence a patří k doposud nejvíce prozkoumaným nebo současně studovaným. I přes odlišné působení těchto TA systémů dokážou všechny koordinovaně, některé samostatně, navodit MDT perzisterů. Toxin TisB je aktivován při poškození DNA fluorochinolonovými antibiotiky a narušuje protonmotivní sílu na buněčné membráně, což vede k poklesu intracelulárního množství ATP. Stejně působí i GhoT toxin. GhoST TA systém byl však objeven teprve nedávno a mechanismus účinku není zatím zcela objasněn. Toxinové části TA systémů HipBA, RelBE a MazEF inhibují proteosyntézu narušením translace. HipA toxin fosforylací deaktivuje GltX při nedostatku aminokyselin, RelE a MazF toxiny jsou specifické endoribonukleázy štěpící mRNA také při nedostatku živin. MazF toxin však proteosyntézu neinhibuje kompletně. Po specifickém štěpení 16S rRNA v ribozomu, vznikají „stresové-ribozomy“, které jsou schopné překládat toxinem specificky naštěpené mRNA, jejichž produkty se pravděpodobně mohou v perzistenci dále uplatňovat. YafQ a MqsR toxin mají také specifickou ribonukleázovou aktivitu. MqsR však není sám o sobě schopen vyvolat perzistenci a jak MqsRA, tak i DinJ-YafQ TA systém regulují další fyziologické procesy.

Přesné mechanismy, které jsou při expresi toxinů odpovědné za zvýšení perzistence, však stále nejsou plně charakterizovány. V budoucnu můžeme očekávat objevení nových TA systémů, které mají určitou roli v perzistenci. Samotné TA systémy a procesy, které ovlivňují, jsou velmi komplexní a stále jsme na začátku v jejich chápání. Detailnější porozumění mechanismům tvorby perzisterů může urychlit vývoj specifických léků proti perzisterům a zlepšit léčbu chronických infekčních onemocnění. TA systémy se tak jeví jako atraktivní cíl pro nové antimikrobiální látky.

## 6. Použitá literatura

**Adams, K. N., Takaki, K., Connolly, L. E., Wiedenhof, H., Winglee, K., Humbert, O., Edelstein, P. H., Cosma, C. L., and Ramakrishnan, L. (2011)** Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell* 145(1): 39–53.

**Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (1996)** An Escherichia coli chromosomal 'addiction module' regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(12): 6059–6063.

**Akiyama, M., Crooke, E., and Kornberg, A. (1992)** The polyphosphate kinase gene of Escherichia coli. Isolation and sequence of the ppk gene and membrane location of the protein. *The Journal of biological chemistry* 267(31): 22556–61.

**Akiyama, M., Crooke, E., and Kornberg, A. (1993)** An exopolyphosphatase of Escherichia coli. The enzyme and its ppk gene in a polyphosphate operon. *The Journal of biological chemistry* 268(1): 633–9.

**Amato, S. M., Orman, M. A., and Brynildsen, M. P. (2013)** Metabolic control of persister formation in Escherichia coli. *Molecular cell* 50(4): 475–87.

**Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A., and Engelberg-Kulka, H. (2009)** Escherichia coli MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both 'death proteins' and 'survival proteins'. *PLoS genetics* 5(3): e1000390.

**An, G., Justesen, J., Watson, R. J., and Friesen, J. D. (1979)** Cloning the spoT gene of Escherichia coli: identification of the spoT gene product. *Journal of bacteriology* 137(3): 1100–10.

**Anderson, D. G., and Kowalczykowski, S. C. (1997)** The Translocating RecBCD Enzyme Stimulates Recombination by Directing RecA Protein onto ssDNA in a  $\chi$ -Regulated Manner. *Cell* 90(1): 77–86.

**Armalyte, J., Jurenaite, M., Beinoravičiūtė, G., Teiserskas, J., and Suziedeliene, E. (2012)** Characterization of Escherichia coli dinJ-yafQ toxin-antitoxin system using insights from mutagenesis data. *Journal of bacteriology* 194(6): 1523–32.

**Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004)** Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science (New York, N.Y.)* 305(5690): 1622–5.

**Battesti, A., and Bouveret, E. (2006)** Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Molecular microbiology* 62(4): 1048–63.

**Bernier, S. P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A. S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2013)** Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS genetics* 9(1): e1003144.

**Bigger, J. (1944)** TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet* 244(6320): 497–500.

- Black, D. S., Irwin, B., and Moyed, H. S. (1994)** Autoregulation of hip, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J. Bacteriol.* 176(13): 4081–4091.
- Black, D. S., Kelly, A. J., Mardis, M. J., and Moyed, H. S. (1991)** Structure and organization of hip, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *Journal of bacteriology* 173(18): 5732–9.
- Bøggild, A., Sofos, N., Andersen, K. R., Feddersen, A., Easter, A. D., Passmore, L. A., and Brodersen, D. E. (2012)** The crystal structure of the intact *E. coli* RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity. *Structure (London, England : 1993)* 20(10): 1641–8.
- Bokinsky, G., Baidoo, E. E. K., Akella, S., Burd, H., Weaver, D., Alonso-Gutierrez, J., García-Martín, H., Lee, T. S., and Keasling, J. D. (2013)** HipA-triggered growth arrest and  $\beta$ -lactam tolerance in *Escherichia coli* are mediated by RelA-dependent ppGpp synthesis. *Journal of bacteriology* 195(14): 3173–82.
- Brown, B. L., Grigoriu, S., Kim, Y., Arruda, J. M., Davenport, A., Wood, T. K., Peti, W., and Page, R. (2009)** Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoS pathogens* 5(12): e1000706.
- Brown, B. L., Lord, D. M., Grigoriu, S., Peti, W., and Page, R. (2013)** The *Escherichia coli* toxin MqsR destabilizes the transcriptional repression complex formed between the antitoxin MqsA and the mqsRA operon promoter. *The Journal of biological chemistry* 288(2): 1286–94.
- Brown, B. L., Wood, T. K., Peti, W., and Page, R. (2011)** Structure of the *Escherichia coli* antitoxin MqsA (YgiT/b3021) bound to its gene promoter reveals extensive domain rearrangements and the specificity of transcriptional regulation. *The Journal of biological chemistry* 286(3): 2285–96.
- Cataudella, I., Trusina, A., Sneppen, K., Gerdes, K., and Mitarai, N. (2012)** Conditional cooperativity in toxin-antitoxin regulation prevents random toxin activation and promotes fast translational recovery. *Nucleic acids research* 40(14): 6424–34.
- Correia, F. F., D’Onofrio, A., Rejtar, T., Li, L., Karger, B. L., Makarova, K., Koonin, E. V., and Lewis, K. (2006)** Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 188(24): 8360–7.
- Da Re, S., and Ghigo, J.-M. (2006)** A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 188(8): 3073–87.
- Darfeuille, F., Unoson, C., Vogel, J., and Wagner, E. G. H. (2007)** An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Molecular cell* 26(3): 381–92.
- De Smit, M. H., and van Duin, J. (2003)** Translational standby sites: how ribosomes may deal with the rapid folding kinetics of mRNA. *Journal of molecular biology* 331(4): 737–43.
- Dörr, T., Lewis, K., and Vulić, M. (2009)** SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS genetics* 5(12): e1000760.
- Dörr, T., Vulić, M., and Lewis, K. (2010)** Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS biology* 8(2): e1000317.
- Fasani, R. A., and Savageau, M. A. (2013)** Molecular mechanisms of multiple toxin-antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(27): E2528–37.
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., and Gerdes, K. (2013)** Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Molecular cell* 52(2): 248–54.
- Germain, E., Roghanian, M., Gerdes, K., and Maisonneuve, E. (2015)** Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(16): 5171–5176.

- Goeders, N., Drèze, P.-L., and Van Melderren, L. (2013)** Relaxed cleavage specificity within the RelE toxin family. *Journal of bacteriology* 195(11): 2541–9.
- Gotfredsen, M., and Gerdes, K. (1998)** The Escherichia coli relBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Molecular Microbiology* 29(4): 1065–1076.
- Gurnev, P. A., Ortenberg, R., Dörr, T., Lewis, K., and Bezrukov, S. M. (2012)** Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. *FEBS letters* 586(16): 2529–34.
- Hadjifrangiskou, M., Kostakioti, M., and Hultgren, S. J. (2011)** Antitoxins: therapy for stressed bacteria. *Nature chemical biology* 7(6): 345–7.
- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A., and Normark, S. (1995)** Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in Escherichia coli K-12. *Molecular Microbiology* 18(4): 661–670.
- Hansen, S., Vulić, M., Min, J., Yen, T.-J., Schumacher, M. A., Brennan, R. G., and Lewis, K. (2012)** Regulation of the Escherichia coli HipBA toxin-antitoxin system by proteolysis. *PloS one* 7(6): e39185.
- Haseltine, W. A., and Block, R. (1973)** Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(5): 1564–8.
- Heath, R. J., Jackowski, S., and Rock, C. O. (1994)** Guanosine tetrphosphate inhibition of fatty acid and phospholipid synthesis in Escherichia coli is relieved by overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsB). *The Journal of biological chemistry* 269(42): 26584–90.
- Helaine, S., Cheverton, A. M., Watson, K. G., Faure, L. M., Matthews, S. A., and Holden, D. W. (2014)** Internalization of Salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science (New York, N.Y.)* 343(6167): 204–8.
- Hengge, R. (2009)** Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 7(4): 263–73.
- Hobby, G. L., Meyer, K., and Chaffee, E. (1942)** Observations on the Mechanism of Action of Penicillin. *Experimental Biology and Medicine* 50(2): 281–285.
- Hogarth, B. G., and Higgins, C. F. (1983)** Genetic organization of the oligopeptide permease (opp) locus of Salmonella typhimurium and Escherichia coli. *Journal of bacteriology* 153(3): 1548–51.
- Hu, Y., Benedik, M. J., and Wood, T. K. (2012)** Antitoxin DinJ influences the general stress response through transcript stabilizer CspE. *Environmental microbiology* 14(3): 669–79.
- Hu, Y., Kwan, B. W., Osbourne, D. O., Benedik, M. J., and Wood, T. K. (2015)** Toxin YafQ increases persister cell formation by reducing indole signalling. *Environmental microbiology* 17(4): 1275–85.
- Chen, C. R., Malik, M., Snyder, M., and Drlica, K. (1996)** DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *Journal of molecular biology* 258(4): 627–37.
- Cheng, H.-Y., Soo, V. W. C., Islam, S., McAnulty, M. J., Benedik, M. J., and Wood, T. K. (2014)** Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. *Environmental microbiology* 16(6): 1741–54.
- Christensen, S. K., and Gerdes, K. (2003)** RelE toxins from Bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Molecular Microbiology* 48(5): 1389–1400.
- Christensen, S. K., Mikkelsen, M., Pedersen, K., and Gerdes, K. (2001)** RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(25): 14328–33.

- Christensen-Dalsgaard, M., Jørgensen, M. G., and Gerdes, K. (2010)** Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Molecular microbiology* 75(2): 333–48.
- Kamada, K., Hanaoka, F., and Burley, S. K. (2003)** Crystal Structure of the MazE/MazF Complex. *Molecular Cell* 11(4): 875–884.
- Kasari, V., Mets, T., Tenson, T., and Kaldalu, N. (2013)** Transcriptional cross-activation between toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli*. *BMC microbiology* 13(1): 45.
- Kaspy, I., Rotem, E., Weiss, N., Ronin, I., Balaban, N. Q., and Glaser, G. (2013)** HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nature communications* 4: 3001.
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., and Lewis, K. (2004)** Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters* 230(1): 13–18.
- Keren, I., Minami, S., Rubin, E., and Lewis, K. (2011)** Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. *mBio* 2(3): e00100–11.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., and Lewis, K. (2004)** Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 186(24): 8172–80.
- Keren, I., Wu, Y., Inocencio, J., Mulcahy, L. R., and Lewis, K. (2013)** Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science (New York, N.Y.)* 339(6124): 1213–6.
- Kim, Y., Wang, X., Zhang, X.-S., Grigoriu, S., Page, R., Peti, W., and Wood, T. K. (2010)** *Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD. *Environmental Microbiology* 12(5): 1105–1121.
- Kim, Y., and Wood, T. K. (2010)** Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications* 391(1): 209–13.
- Kint, C. I., Verstraeten, N., Fauvart, M., and Michiels, J. (2012)** New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends in microbiology* 20(12): 577–85.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., and Collins, J. J. (2007)** A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130(5): 797–810.
- Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., and Kornberg, A. (1997)** Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 272(34): 21240–3.
- Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N. Q., and Leibler, S. (2005)** Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics* 169(4): 1807–14.
- Lacour, S., and Landini, P. (2004)** SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *Journal of bacteriology* 186(21): 7186–95.
- Langklotz, S., and Narberhaus, F. (2011)** The *Escherichia coli* replication inhibitor CspD is subject to growth-regulated degradation by the Lon protease. *Molecular microbiology* 80(5): 1313–25.
- Lee, J., Bansal, T., Jayaraman, A., Bentley, W. E., and Wood, T. K. (2007)** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* biofilms are inhibited by 7-hydroxyindole and stimulated by isatin. *Applied and environmental microbiology* 73(13): 4100–9.
- Leung, V., and Lévesque, C. M. (2012)** A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. *Journal of bacteriology* 194(9): 2265–74.
- Lewis, K. (2007)** Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature reviews. Microbiology* 5(1): 48–56.

- Li, G.-Y., Zhang, Y., Inouye, M., and Ikura, M. (2008)** Structural mechanism of transcriptional autorepression of the *Escherichia coli* RelB/RelE antitoxin/toxin module. *Journal of molecular biology* 380(1): 107–19.
- Li, G.-Y., Zhang, Y., Inouye, M., and Ikura, M. (2009)** Inhibitory mechanism of *Escherichia coli* RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site. *The Journal of biological chemistry* 284(21): 14628–36.
- Liang, Y., Gao, Z., Wang, F., Zhang, Y., Dong, Y., and Liu, Q. (2014)** Structural and functional characterization of *Escherichia coli* toxin-antitoxin complex DinJ-YafQ. *The Journal of biological chemistry* 289(30): 21191–202.
- Little, J. W., Edmiston, S. H., Pacelli, L. Z., and Mount, D. W. (1980)** Cleavage of the *Escherichia coli* *lexA* protein by the *recA* protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77(6): 3225–3229.
- Liu, Y., and Imlay, J. A. (2013)** Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science (New York, N.Y.)* 339(6124): 1210–3.
- Luidalepp, H., Jöers, A., Kaldalu, N., and Tenson, T. (2011)** Age of inoculum strongly influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered persistence. *Journal of bacteriology* 193(14): 3598–605.
- Maciąg, M., Kochanowska, M., Łyżeń, R., Węgrzyn, G., and Szalewska-Pałasz, A. (2010)** ppGpp inhibits the activity of *Escherichia coli* DnaG primase. *Plasmid* 63(1): 61–67.
- Magnuson, R. D. (2007)** Hypothetical functions of toxin-antitoxin systems. *Journal of bacteriology* 189(17): 6089–92.
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., and Gerdes, K. (2013)** (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. *Cell* 154(5): 1140–1150.
- Marianovsky, I., Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (2001)** The regulation of the *Escherichia coli* *mazEF* promoter involves an unusual alternating palindrome. *The Journal of biological chemistry* 276(8): 5975–84.
- Möker, N., Dean, C. R., and Tao, J. (2010)** *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *Journal of bacteriology* 192(7): 1946–55.
- Monod, J. (1949)** The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology* 3(1): 371–394.
- Moyed, H. S., and Bertrand, K. P. (1983)** *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of bacteriology* 155(2): 768–75.
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnell, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E., and Singh, P. K. (2011)** Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science (New York, N.Y.)* 334(6058): 982–6.
- Orman, M. A., and Brynildsen, M. P. (2013)** Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57(7): 3230–9.
- Overgaard, M., Borch, J., Jørgensen, M. G., and Gerdes, K. (2008)** Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Molecular microbiology* 69(4): 841–57.
- Pagès, J.-M., James, C. E., and Winterhalter, M. (2008)** The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 6(12): 893–903.
- Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W., and Gourse, R. L. (2004)** DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* 118(3): 311–22.
- Paul, B. J., Berkmen, M. B., and Gourse, R. L. (2005)** DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(22): 7823–8.
- Pedersen, K., Zavialov, A. V., Pavlov, M. Y., Elf, J., Gerdes, K., and Ehrenberg, M. (2003)** The Bacterial Toxin RelE Displays Codon-Specific Cleavage of mRNAs in the Ribosomal A Site. *Cell* 112(1): 131–140.

- Phadtare, S., and Inouye, M. (2001)** Role of CspC and CspE in Regulation of Expression of RpoS and UspA, the Stress Response Proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 183(4): 1205–1214.
- Phillips, I., Culebras, E., Moreno, F., and Baquero, F. (1987)** Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 20(5): 631–8.
- Prysak, M. H., Mozdzierz, C. J., Cook, A. M., Zhu, L., Zhang, Y., Inouye, M., and Woychik, N. A. (2009)** Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Molecular microbiology* 71(5): 1071–87.
- Que, Y.-A., Hazan, R., Strobel, B., Maura, D., He, J., Kesarwani, M., Panopoulos, P., Tsurumi, A., Giddey, M., Wilhelmy, J., Mindrinos, M. N., and Rahme, L. G. (2013)** A quorum sensing small volatile molecule promotes antibiotic tolerance in bacteria. *PloS one* 8(12): e80140.
- Rasmussen, A. A., Johansen, J., Nielsen, J. S., Overgaard, M., Kallipolitis, B., and Valentin-Hansen, P. (2009)** A conserved small RNA promotes silencing of the outer membrane protein YbfM. *Molecular microbiology* 72(3): 566–77.
- Rotem, E., Loinger, A., Ronin, I., Levin-Reisman, I., Gabay, C., Shores, N., Biham, O., and Balaban, N. Q. (2010)** Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(28): 12541–6.
- Ruangprasert, A., Maehigashi, T., Miles, S. J., Giridharan, N., Liu, J. X., and Dunham, C. M. (2014)** Mechanisms of toxin inhibition and transcriptional repression by *Escherichia coli* DinJ-YafQ. *The Journal of biological chemistry* 289(30): 20559–69.
- Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K., and Lewis, K. (2006)** Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC microbiology* 6(1): 53.
- Schumacher, M. A., Min, J., Link, T. M., Guan, Z., Xu, W., Ahn, Y.-H., Soderblom, E. J., Kurie, J. M., Evdokimov, A., Moseley, M. A., Lewis, K., and Brennan, R. G. (2012)** Role of unusual P loop ejection and autophosphorylation in HipA-mediated persistence and multidrug tolerance. *Cell reports* 2(3): 518–25.
- Schumacher, M. A., Piro, K. M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., and Brennan, R. G. (2009)** Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science (New York, N.Y.)* 323(5912): 396–401.
- Solopova, A., van Gestel, J., Weissing, F. J., Bachmann, H., Teusink, B., Kok, J., and Kuipers, O. P. (2014)** Bet-hedging during bacterial diauxic shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(20): 7427–32.
- Soo, V. W. C., and Wood, T. K. (2013)** Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD. *Scientific reports* 3: 3186.
- Steinbrecher, T., Prock, S., Reichert, J., Wadhwani, P., Zimpfer, B., Bürck, J., Berditsch, M., Elstner, M., and Ulrich, A. S. (2012)** Peptide-lipid interactions of the stress-response peptide TisB that induces bacterial persistence. *Biophysical journal* 103(7): 1460–9.
- Svitil, A. L., Cashel, M., and Zyskind, J. W. (1993)** Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis in vivo. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 268(4): 2307–11.
- Tashiro, Y., Kawata, K., Taniuchi, A., Kakinuma, K., May, T., and Okabe, S. (2012)** RelE-mediated dormancy is enhanced at high cell density in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 194(5): 1169–76.
- Tripathi, A., Dewan, P. C., Siddique, S. A., and Varadarajan, R. (2014)** MazF-induced growth inhibition and persister generation in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 289(7): 4191–205.
- Unoson, C., and Wagner, E. G. H. (2008)** A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 70(1): 258–70.

- Vega, N. M., Allison, K. R., Khalil, A. S., and Collins, J. J. (2012)** Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nature chemical biology* 8(5): 431–3.
- Vesper, O., Amitai, S., Belitsky, M., Byrgazov, K., Kaberdina, A. C., Engelberg-Kulka, H., and Moll, I. (2011)** Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell* 147(1): 147–57.
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., and D'Ari, R. (2005)** Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 56(4): 958–70.
- Visick, J., and Clarke, S. (1997)** RpoS- and OxyR-independent induction of HPI catalase at stationary phase in *Escherichia coli* and identification of rpoS mutations in common laboratory strains. *J. Bacteriol.* 179(13): 4158–4163.
- Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E. G. H., and Altuvia, S. (2004)** The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Current biology : CB* 14(24): 2271–6.
- Wagner, E. G. H., and Unoson, C. (2012)** The toxin-antitoxin system tisB-istR1: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes. *RNA biology* 9(12): 1513–9.
- Wakamoto, Y., Dhar, N., Chait, R., Schneider, K., Signorino-Gelo, F., Leibler, S., and McKinney, J. D. (2013)** Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. *Science (New York, N.Y.)* 339(6115): 91–5.
- Wang, X., Kim, Y., Hong, S. H., Ma, Q., Brown, B. L., Pu, M., Tarone, A. M., Benedik, M. J., Peti, W., Page, R., and Wood, T. K. (2011)** Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nature chemical biology* 7(6): 359–66.
- Wang, X., Lord, D. M., Hong, S. H., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R., and Wood, T. K. (2013)** Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. *Environmental microbiology* 15(6): 1734–44.
- Wang, X., Lord, D. M., Cheng, H.-Y., Osbourne, D. O., Hong, S. H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R., and Wood, T. K. (2012)** A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature chemical biology* 8(10): 855–61.
- Wen, Y., Behiels, E., and Devreese, B. (2014)** Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathogens and disease* 70(3): 240–9.
- Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, D. N., Marahiel, M. A., and Nierhaus, K. H. (2002)** Dissection of the Mechanism for the Stringent Factor RelA. *Molecular Cell* 10(4): 779–788.
- Wu, Y., Vulić, M., Keren, I., and Lewis, K. (2012)** Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56(9): 4922–6.
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., and Cashel, M. (1991)** Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *The Journal of biological chemistry* 266(9): 5980–90.
- Yamaguchi, Y., Park, J.-H., and Inouye, M. (2009)** MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 284(42): 28746–53.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hara, H., Kato, I., and Inouye, M. (2005)** Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *The Journal of biological chemistry* 280(5): 3143–50.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K. P., Ikura, M., Qing, G., and Inouye, M. (2003)** MazF Cleaves Cellular mRNAs Specifically at ACA to Block Protein Synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Cell* 12(4): 913–923.
- Zhao, J., Wang, Q., Li, M., Heijstra, B. D., Wang, S., Liang, Q., and Qi, Q. (2013)** *Escherichia coli* toxin gene hipA affects biofilm formation and DNA release. *Microbiology (Reading, England)* 159(Pt 3): 633–40.